

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
(Direktor: Professor Dr. H. Raettig)

DIE HUMORALE SEKUNDÄR- UND HYPERIMMUNREAKTION
NACH ORALER GABE VON RINDERSEBUMALBUMIN (BSA)
BEIM KANINCHEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans Lefèvre
aus Pulsnitz

Berlin 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550821_0025

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin
Abteilung für Bakteriologie und Seuchenforschung
(Direktor: Professor Dr. H. Raettig)

**DIE HUMORALE SEKUNDÄR- UND HYPERIMMUNREAKTION
NACH ORALER GABE VON RINDERSERUMALBUMIN (BSA)
BEIM KANINCHEN**



Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans Lefèvre

aus Pulsnitz

Berlin 1969

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz N a u m a n n
Referent: Professor Dr. med. Hansjürgen R a e t t i g
Korreferent: Professor Dr. med. Herbert H e r x h e i m e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 23.9.1969

Die Bildung von humoralen Antikörpern gegen Antigene, die über den Magendarmtrakt zugeführt werden, ist eine alte Erfahrung der Immunforschung. Die Kenntnisse jedoch davon, welcher Art diese Immunreaktion ist, sind im Vergleich zum Wissen über die Immunreaktion nach parenteraler Antigenzufuhr unbefriedigend. Dies findet dadurch eine Erklärung, daß die Antigenzufuhr über den Magendarmtrakt schwer zu übersehen ist: es muß der fermentative Abbau, der die Antigendosis beeinflusst, berücksichtigt werden, an die Möglichkeit von Alterationen des Antigens im Darmlumen oder beim Durchtritt durch die Schleimhäute gedacht werden, und schließlich ist es ungewiß, wie weit lokal eine Immunreaktion Einfluß auf das Antigen und das Spektrum der im Serum nachweisbaren Antikörper hat.

Der lokalen Synthese von Antikörpern in den verschiedenen Schleimhäuten wurde in letzter Zeit größere Aufmerksamkeit gewidmet, und wir wissen heute, daß Immunglobuline der Klassen IgA, IgG und IgM lokal von immunkompetenten Zellen gebildet werden und in den Sekreten nachweisbar sind (1, 2, 8, 13, 14, 16, 17, 26, 29, 38, 53).

Diese Antikörper haben sicherlich für die lokale Abwehr von Antigenen eine große Bedeutung, möglicherweise sogar eine größere als humorale Antikörper. Fraglich ist allerdings, wie weit die lokale Immunantwort Einfluß auf die humorale Antikörperbildung nimmt.

In dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob durch den Weg des Antigens über den Darm sich die Immunreaktion, wie sie in Quantität und Qualität der Antikörper im Serum wieder-
gespiegelt wird, von der nach parenteraler Antigenzufuhr unterscheidet.

Die Voraussetzung für eine humorale Antikörperbildung auf oralem Wege, wenn sie ähnlich der nach parenteraler Immunisierung sein soll, ist die, daß Antigene über den Darm unverändert den Kreislauf erreichen.

Geht man von der klassischen Definition des Antigens aus,

wonach ein Stoff dann als Antigen wirksam werden kann, wenn eine bestimmte Molekülgröße vorliegt, es sich um ein Protein (bzw. der determinierende Stoff an ein Protein gebunden wird: Hapten), und die Substanz vom Makroorganismus als "fremd" erkannt wird, und ordnet man dieser Definition auch moderne Anschauungen hinzu (78), wonach die Konformation und der chemische Aufbau des Moleküls, die Resorptions- und Abbaufähigkeit des Moleküls und schließlich die Reaktionslage des Organismus berücksichtigt werden müssen, so muß festgestellt werden, daß der Magendarmtrakt einer sehr großen Anzahl von Antigenen ausgesetzt ist, die durch normale, verschmutzte oder infizierte Nahrungsmittel und Getränke oder orale Berührung zugeführt werden.

Proteine werden im Darmtrakt weitgehend durch proteolytische Fermente zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut und verlieren dadurch ihre Antigenität. Allerdings konnte BORGSTRÖM (11) nachweisen, daß am Ende des Jejunums noch 10% der Nahrungsproteine unverändert vorliegen. Außerdem muß daran gedacht werden, daß die Proteine längere Zeit im Darm liegen, bevor sie durch Proteolyse aufgespalten werden, und es ist heute klar, daß solche Moleküle unverändert in den Kreislauf gelangen können (49, 64). Ebenso ist die Aufnahme sogar von Partikeln (Zellulose, Pollen, Sporen, Hefezellen, Stärkekörner und sogar Sandkörnchen) bis zu einer Größe von 150 Mikron durch Persorption bewiesen (94). Grundsätzlich ist es demnach möglich, daß Antigene über den Darm den Kreislauf erreichen, und von da an müßten sie immunologisch eine gleiche Reaktion auslösen wie parenteral zugeführte Antigene.

Die Bildung humoraler Antikörper nach oraler Immunisierung ist bisher unter verschiedenen Aspekten betrachtet worden.

In der Blutgruppenforschung war die Entstehung der Isoantikörper Anti-A und Anti-B lange umstritten. Die Auffassung, daß die Isoantikörper durch orale Immunisierung entstehen, ist zuerst von DUPONT (22) 1934 diskutiert worden. SPRINGER (76) konnte bei Hühnern, die normalerweise ein Anti-B-artiges Agglutinin bilden, diese Antikörperbildung für längere Zeit verhindern, indem er die Tiere keimfrei aufzog und dadurch die orale Zufuhr von B-An-

tigen vermied. Dagegen bildeten in dieser Weise gehaltene Tiere sofort ein Anti-B, wenn der Nahrung B-Antigen-tragende Escherichia coli O₈₆-Bakterien (56, 57) beigelegt wurden. Es gelang auch bei Kaninchen Anti-A und Anti-B Antikörper zu erzeugen, indem ihnen E. coli-Bakterien gefüttert wurden.

Daß beim Menschen die Isoantikörper auch durch orale Immunisierung entstehen, wurde dadurch sehr wahrscheinlich gemacht, daß es gelang, durch orale Gabe von E. coli O₈₆ den Anti-B-Titer zu steigern (77), und daß eine Abhängigkeit der Isoantikörpertiter von der Stuhlflora besteht (44). VOGT, GIBB und PROKOP (93) erzielten nach oraler Verabreichung von Mucitect (einer A-Substanz aus Schweinemagen) bei einigen ihrer dreißig Versuchspersonen einen deutlichen Anstieg des Anti-A-Titers. Hier haben wir also ein Modell vor uns, das zeigt, daß natürlicherweise durch orale Immunisierung humorale Antikörper entstehen. Die Blutgruppenisoantikörper nehmen aber insofern eine Sonderstellung ein, daß es sich dabei vorwiegend um IgM-Antikörper handelt und diese mit relativ hohem Titer bis ins späte Alter erhalten bleiben. Die möglichen Ursachen sollen hier nicht besprochen werden.

Eine andere Forschungsrichtung beschäftigt sich mit der humoralen Antikörperbildung gegen Nahrungsproteine. Diese ist für die vorliegende Untersuchung deshalb von besonderer Bedeutung, weil für unsere Untersuchungen bovines Serumalbumin als Antigen benutzt wurde, das sich gut vergleichen läßt mit den Proteinen der Kuhmilch, über die die meisten Kenntnisse bei der Immunisierung mit Nahrungsproteinen vorliegen.

1906 bereits wurden präzipitierende Antikörper gegen Kuhmilch im Serum atrophischer Kinder nachgewiesen (50), ebenso das Vorkommen von Milchproteinen in den Seren solcher Kinder (7), was als die Voraussetzung für den Immunisierungsmechanismus angesehen werden muß.

Bald konnte auch gezeigt werden, daß in den Seren der meisten Kinder, die mit Kuhmilch ernährt werden, präzipitierende Antikörper gegen Milchproteine zu finden sind (4, 72) und daß auch andere Nahrungsantigene wie Fisch- und Eiweiße in den Kreislauf gelangen können (95, 31). 1931 berichteten GYORGY, MORO und WITEBSKY (33), daß bei 69 gesunden Säuglingen, die mit Kuhmilch ernährt wurden, in 40 Fällen komplementbindende Milchantikörper nachzuweisen waren.

"Diese Antikörper entsprechen in ihren Eigenschaften gemeinen Immunantikörpern (nach Art der Präcipitine) und unterscheiden sich von jenen, die für die Genese des Ekzema infantum von mutmaßlicher Bedeutung sind."

In neuerer Zeit ist die orale Immunisierung gegen Milchproteine eingehender studiert worden. Vor allem interessierte die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen kindlichen Erkrankungen des Respirationstraktes und Darmes und der Bildung von Antikörpern gegen Milch gibt. GUNTHER u.a. (32), der Antikörper gegen Milchproteine sowohl bei gesunden wie auch bei kranken Kindern im passiven Hämmagglutinationstest mit zum Teil hohen Titern (bis 1:1000) nachwies, diskutierte, ob es einen Zusammenhang zwischen dem "cot death" (plötzlicher Tod von Säuglingen) und diesen Milchantikörpern gibt.

HOLLAND u.a. (37) fand bei 87 von 1618 untersuchten Kindern präcipitierende Antikörper gegen Milch. ROTHBERG und FARR (67) konnten mit einer sehr empfindlichen Methode (Antigen-J 131-Bindungskapazität) sogar bei 75% gesunder Kinder Antikörper gegen Rinderalbumin feststellen. Es scheint schließlich ein Zusammenhang zwischen der Colitis ulcerosa, bestimmten Formen von Enteritis, Sprue und Erkrankungen des Respirationstraktes bei Kindern auf der einen und Antikörpern gegen Milchproteine auf der anderen Seite zu geben (15, 34, 35, 37, 55, 73, 86, 87). HOLLAND (37) zeigte, daß Antikörper häufiger gegen das Albumin und Globulin der Milch gebildet werden, als gegen die übrigen Milchproteine. Eindrucksvoll sind auch Befunde von KIVEL u.a. (43), der Antikörper gegen Milch, Hühnereiweiß, Gluten, Gliadin und sogar Kaninchenserumproteine im Serum von 2-10 % gesunder Erwachsener fand, und zeigte, daß dieser Prozentsatz auf 26-58 % bei an Sprue erkrankten Patienten anstieg.

Von besonderer Bedeutung sind Befunde von KORENBLAT u.a. (45), der es sehr wahrscheinlich machen konnte, daß im Laufe des Lebens eine Immuntoleranz gegen Nahrungsproteine erworben wird. Darauf werde ich noch genauer bei der Diskussion der Frage eingehen, ob es nicht zur humoralen Antikörperbildung gegen alle Nahrungsproteine kommen müßte.

Die dritte Arbeitsrichtung auf dem Gebiet der oralen Immunisierung ist die, auf oralem Wege mit abgeschwächten oder abgetöteten Krankheitserregern zu immunisieren, um einen Schutz gegen Infektionen zu erreichen. Dieser Gedanke ist alt. Schon 1905 dachten WASSERMANN und CITRON (96) daran, gegen Cholera und Typhus oral zu impfen. 1906 konnte LÖFFLER (48) Tiere oral gegen Salmonellainfektionen immunisieren. BESREDKA (10) entwickelte die Vorstellung, daß der Organismus lokal einen Abwehrmechanismus gegen Krankheitserreger aufbauen kann, ohne daß dieser Schutz unbedingt durch Antikörper vermittelt sein muß. In den letzten Jahren hat besonders RAETTIG die Diskussion um die orale Immunisierung neu belebt. Ausgehend von Beobachtungen, daß Soldaten, die im Felde waren, nach den zwei Kriegen weniger häufig an Typhus erkrankten als die Zivilbevölkerung, und dieser Schutz unabhängig von vorausgegangener Impfung war (60), untersuchte er die Wirkung oraler Immunisierung im Modell von Mäuseepidemien. Er zeigte, daß Phagen und Viren nach oraler Verfütterung nach wenigen Minuten im Kreislauf nachweisbar werden (59) und daß auch radiomarkierte *S. typhimurium*-Keime in kurzer Zeit generalisiert im Organismus der Ratte auftreten (pers. Mitt.) Die Mortalität von Mäusen nach Infektion mit *S. typhi murium* konnte durch vorausgehende orale Immunisierung mit demselben hitzeinaktivierten Keim um die Hälfte gesenkt werden (61). Ein unspezifischer Schutz wurde auch durch nicht spezifische Impfung erzielt (62). Bei der oralen Immunisierung mit Krankheitserregern, ist die Bedeutung humoraler Antikörper ein besonderes Problem. Obwohl humorale Antikörper oft nachweisbar sind, gibt dieser Befund keine genügende Auskunft über die erreichte Immunität (63). Das kann nur daran liegen, daß die lokale Immunreaktion (immunkompetente Zellen in der Darmwand) einen wesentlichen Beitrag zum Schutz vor der Infektion leistet. So ist auch die lokale Immunglobulinbildung gegen verschiedene Keime, die mit der Schleimhaut in Kontakt gekommen sind, nachgewiesen (26, 41, 74) und möglicherweise spielen dabei auch "Reagine" eine Rolle, die mit der PCA-Reaktion nach oraler Gabe von Ei-Albumin im Darm nachgewiesen wurden, deren Natur aber noch ungeklärt ist (66).

Gerade die neueren Befunde der lokalen Immunreaktion haben zu den eigenen Untersuchungen angeregt.

Wenn nach Zufuhr eines Antigens über den Magendarmtrakt ein zusätzlicher, nach parenteraler Immunisierung nicht in Gang gesetzter lokaler Immunmechanismus eine Rolle spielt, so ist die schon oben aufgeworfene Frage unausweichlich, ob dieser die humorale Antikörperbildung beeinflusst.

Aufgabenstellung

Die Primär-, Sekundär- und Hyperimmunreaktion nach parenteraler Immunisierung ist nach Qualität, Quantität und zeitlichen Verhältnissen der Antikörperbildung genau charakterisiert.

Die Primärantwort nach oralen Immunisierung mit bovinem Serumalbumin ist von ROTHBERG u.a. (69) untersucht worden, und unterscheidet sich nicht von der nach parenteraler Immunisierung. Darauf wird in der Diskussion noch näher eingegangen. In eigenen Versuchen sollte untersucht werden, ob nach oralen Immunisierung die humorale sekundäre und Hyperimmunreaktion nach erneuter parenteraler und oraler Antigenzufuhr von der nach primärer parenteraler Immunisierung zu unterscheiden ist.

Um diese Frage zu prüfen, haben wir uns ein Modell gesucht, an dem sich im Tierversuch die aufgeworfenen Fragen prüfen lassen. FARR (24) hatte für solche Versuche Kaninchen benutzt, denen er im Trinkwasser bovines Serumalbumin (BSA) beimischte. Humorale Antikörper ließen sich erstmals am 7. Tag nach Beginn der Antigenbeimischung feststellen. In einer kurzen Mitteilung (23) berichtete dieser Autor auch, daß es möglich sei, bei oral immunisierten Tieren eine typische Sekundärantwort zu beobachten. Auch wir haben für unsere Versuche Kaninchen verwendet, da Kaninchen gute Antikörperbildner und außerdem genügend groß sind, um regelmäßig ausreichende Blutproben entnehmen zu können. Als Antigen benutzten wir ebenfalls BSA:

- 1.) weil es in hoch gereinigter Form im Handel erhältlich ist,
- 2.) weil es sich um ein definiertes Antigen handelt, und sich deshalb genau dosieren läßt,
- 3.) weil die Immunantwort auf parenterale Gabe von Albumin genau studiert ist und
- 4.) weil die Immunisierung mit BSA der des Menschen gegen Kuhmilchproteine sehr nahe kommt.
Wir sind uns allerdings bewußt, daß die Wahl dieses Antigens möglicherweise ein anderes Bild der Sekundär- und Hyperimmunreaktion ergibt, als wenn korpuskuläre Antigene (Keime) verwendet würden.

An diesem Modell wollen wir nun versuchen, folgende Fragen zu beantworten:

1. Läßt sich nach oralen Immunisierung durch erneute orale Antigengabe eine sekundäre Immunreaktion erzeugen?
2. Zeigt sich nach oralen Immunisierung durch parenterale Zweitgabe des Antigens eine typische sekundäre Immunreaktion?
3. Bestehen Unterschiede in der Immunantwort nach parenteraler Zweitgabe des Antigens, wenn dieses subcutan (s. c.), intraperitoneal (i. p.), intravenös (i. v.) oder intramuskulär (i. m.) gegeben wird?
4. Kommt es nach parenteraler Immunisierung durch orale Zweitgabe des Antigens zu einer Sekundärantwort?
5. Wie hoch muß die orale Antigenmenge sein, um vergleichbare Antikörpertiter zur parenteralen Immunisierung zu erhalten?
6. Welcher Art sind die Antikörper, die
 - a) nach oraler Immunisierung
 - b) nach Zweitgabe des Antigens und
 - c) nach Hyperimmunisierungentstehen?
7. Welcher Immunglobulinklasse gehören diese Antikörper an?
8. Unterscheiden sich diese Antikörper von denen, die nach parenteraler Immunisierung entstehen?

MATERIAL und METHODEN

Tiere:

Es wurden 40 weiße Neuseeland-Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2 und 3 kg verwendet. Die Tiere wurden einzeln in geeigneten Käfigen gehalten und mit Trockennahrung Kaninkorn (Fa. Zitrig) und Leitungswasser ernährt. Während des Versuches starben 6 Tiere.

Antigen:

Serum-Albumin vom Rind, trocken, "reinst", der Firma Behringwerke AG RHD 20 wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst: es wurde eine 1%ige Lösung für die parenterale Immunisierung und eine 25%ige Lösung für die orale Immunisierung hergestellt.

Immunisierung:

Zur oralen Immunisierung wurde eine gebogene Schlundsonde verwendet, die zur Vermeidung von Verletzungen an der Spitze eine Olive trug. Nach tiefer Einführung der Sonde in den Schlundraum wurde 1 ml der 25%igen BSA-Lösung (= 250 mg BSA) mit einer Rekordspritze verabreicht. Auf diese Weise wurden die Tiere 10 x in Abständen von zwei Tagen mit jeweils 250 mg BSA oral immunisiert. Die Tiere, die oral geboostert wurden, erhielten als Zweit-, Dritt- und Viertgabe des Antigens je einmal 250 mg BSA in gleicher Weise, bzw. eine Gruppe als Zweitgabe 10 x 250 mg BSA oral in zweitägigen Abständen. Parenteral wurde je 1 ml der 1%igen BSA-Lösung (= 10 mg BSA) mit einer 2er-Kanüle injiziert. Das Immunisierungsschema geht aus Tabelle 1 hervor.

Kanin- chen Nr.	Immunisie- rung		Booster		Booster		Booster		
	T A G E								
	1.	17.	18.	25.	29.	36.	40.	47.	60.
412	250 mg BSA	B L U T E N T N A H M E		B L U T E N T N A H M E		B L U T E N T N A H M E		B L U T E N T N A H M E	G
413	oral 10 x								
430	250mg BSA		250mg BSA		250mg BSA		250mg BSA		
431	oral		oral		oral		oral		
432	10 x								
433									
414	250mg BSA		10mg BSA		10mg BSA		10mg BSA		
417	oral		i.p.		i.p.		i.p.		
418	10 x								
434	10mg BSA		10mg BSA		10mg BSA		10 mg BSA		
437	i.p.		i.p.		i.p.		i.p.		
419	250mg BSA		10mg BSA		10mg BSA		10mg BSA		
420	oral		i.m.		i.m.		i.m.		
421	10 x								
438	10mg BSA		10mg BSA		10mg BSA		10mg BSA		
439	i.m.		i.m.		i.m.		i.m.		
440									
441									
422	250mg BSA	10mg BSA	10mg BSA	10mg BSA					
423	oral	i.v.	i.v.	i.v.					
424	10 x								
452	10mg BSA	10mg BSA	10mg BSA	10mg BSA					
453	i.v.	i.v.	i.v.	i.v.					
454									
455									
426	250mg BSA	10mg BSA	10mg BSA	10mg BSA					
427	oral	s.c.	s.c.	s.c.					
428	10 x	+Adj.	+Adj.	+Adj.					
429									
456	10mg BSA	10mg BSA	10mg BSA	10mg BSA					
457	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.					
458	+Adj.	+Adj.	+Adj.	+Adj.					
		B o o s t e r					44. Tag		
		18. bis 37. T a g							
459	10mg BSA		10 x 250mg BSA oral					Blut- entnahm- e	
460	i.v.								

Tabelle 1: Immunisierung und Boosterung der einzelnen Versuchsgruppen, sowie die Zeiten der Blutentnahmen. Erklärung siehe Text.

Die Versuchstiere wurden in 6 Gruppen geteilt. Die erste Gruppe erhielt 10 x oral 250 mg BSA. Die Blutentnahmen erfolgten in aus der Tabelle ersichtlichen Abständen. Die zweite bis sechste Gruppe wurde in gleicher Weise oral immunisiert. Danach verabreichten wir das Antigen wiederholt in verschiedenen Abständen auf verschiedenen Wegen: intraperitoneal, intramuskulär, intravenös, subkutan und oral. Der für die subkutane Antigengabe vorgesehenen BSA-Lösung war komplettes Freund'sches Adjuvants (Difco) zugesetzt.

Eine siebente Gruppe wurde intravenös immunisiert und erhielt das BSA als Zweitgabe 10 x oral in zweitägigen Abständen. Als Kontrollen dienten vier Gruppen, die anstelle der oralen Immunisierung parenteral auf den verschiedenen angegebenen Wegen immunisiert wurden.

Zwischen den einzelnen Antigengaben wurde den Tieren Blut abgenommen. Die während des Versuches gestorbenen Tiere sind in der Tabelle nicht enthalten.

Zum besseren Verständnis werden im folgenden Text für die einzelnen Versuchsgruppen folgende Bezeichnungen verwendet:

			<u>verwendete Bezeichnung</u>
orale Immunisierung	- orale Booster	=	"oral-oral-Gruppe"
orale "	- kein Booster	=	"oral-Gruppe"
orale "	- i. p. Booster	=	"oral-i. p.-Gruppe"
i. p. "	- i. p. Booster	=	"i. p.-i. p.-Gruppe"
orale "	- i. m. Booster	=	"oral-i. m.-Gruppe"
i. m. "	- i. m. Booster	=	"i. m.-i. m.-Gruppe"
orale "	- i. v. Booster	=	"oral-i. v.-Gruppe"
i. v. "	- i. v. Booster	=	"i. v.-i. v.-Gruppe"
orale "	- s. c. Booster	=	"oral-s. c.-Gruppe"
s. c. "	- s. c. Booster	=	"s. c.-s. c.-Gruppe"
i. v. "	- oraler Booster	=	"i. v.-oral-Gruppe"

Der Tag, an dem das 10. Mal BSA oral gegeben wurde, ist in der Tabelle als 1. Tag bezeichnet. An diesem Tag wurde den Kontrolltieren 10 mg BSA parenteral injiziert.

Blutentnahme:

Allen Tieren wurde vor Versuchsbeginn Blut aus einer Ohrvene entnommen. Zwischen den Antigengaben wurde von allen Tieren durch Herzpunktion Blut gewonnen. Am 47. Versuchstag wurden die Tiere entblutet. Das Blut wurde in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen gesammelt, über Nacht im Kühlschrank belassen und dann das überstehende Serum abgegossen, zentrifugiert und zum Schutz vor Keimbeseidlung mit Natriumacid versetzt. Die so präparierten Seren wurden bei + 4°C aufbewahrt.

Geldiffusionstest (54, 80)

1 g Agar (Difco) wurde mit 100 ml Puffer erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildete. Es wurde Veronapuffer pH 8,4 (M 0,1) benutzt. 3 ml dieser Agarlösung wurden auf einen Objektträger aufgetragen und bis zum Erstarren bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer für 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Mit einer Rosettenstanze (LKB) wurde um ein zentrales Loch sechs Löcher im Abstand von 8 mm eingestantzt. Der Lochdurchmesser betrug 3 mm. Nach Ausaugen der Löcher wurde in das zentrale Loch 0,01 ml 0,5%iges BSA und in die umgebenden Löcher die gleiche Menge der Anti-BSA-Seren eingefüllt.

Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur zur Diffusion belassen und die Präcipitationslinien nach 24 und 48 Stunden abgelesen. Danach wurden die Präparate gewaschen, getrocknet und mit Amidoschwarz gefärbt.

Radiogeldiffusion

Für diesen Test wurden wie für den Geldiffusionstest Objektträger mit Agar präpariert. In das zentrale Loch wurde ein Anti-Kaninchenserum (Behringwerke) vom Esel eingefüllt und in die umgebenden Löcher das zu untersuchende Material. Nach 24 Stunden Diffusion in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur, wurden die Präparate gewaschen: über Nacht in phys. Kochsalzlösung, dann Lösungswechsel und erneut für 6 Stunden in NaCl-Lösung. Danach wurde in das zentrale Loch radioaktiv markiertes BSA eingefüllt und 24 Stunden zur Diffusion in einer feuchten Kammer belassen. Waschen, Trocknen, Färben und Radiographie wurden nun wie bei der Radioimmunelektrophorese angeschlossen.

Komplementbindungsreaktion (40, 81)

Als Indikatorsystem dienten frisch entnommene Hammelerythrozyten, Amboceptor und als Komplement Meerschweinchenserum, das mit einer Lösung von 120 g Natriumacetat plus 40 g Borsäure auf 1 Liter Aqua dest. 1 : 1 vermischt wurde (Haltbarkeit etwa 20 Tage). In Vorversuchen wurde die optimale Sensibilisierung der Hammelerythrozyten mit Amboceptor und die minimale hämolysierende Komplementdosis ermittelt. Nach Inaktivierung des zu untersuchenden Serums (30 Min. im 56°C-Wasserbad) wurde eine bidimensionale Verdünnungsreihe angelegt. In der einen Ebene wurde das Serum von 1 : 10 bis 1 : 160 mit Komplementpuffer (Barbital-Puffer plus Mg^{++} und Ca^{++}) verdünnt, in der anderen wurde von einer 0,1%igen BSA-Lösung eine Verdünnungsreihe von 1 : 1000 bis 1 : 16 000 angelegt.

In jedes Röhrchen wurde 0,1 ml BSA (in der entsprechenden Verdünnung), 0,1 ml Serum (in der entsprechenden Verdünnung) und 0,1 ml Komplement in der im Vorversuch ermittelten Verdünnung eingefüllt. Danach wurde der Ansatz 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und über Nacht (18 Std.) im Kühlschrank belassen. Am nächsten Morgen wurden in jedes Röhrchen 0,1 ml einer 2%igen Hammelerythrozytensuspension (in Komplementpuffer) und 0,1 ml der vorher ermittelten optimalen Amboceptorverdünnung eingefüllt. Nach Inkubation des Ansatzes für 60 Minuten im 37°C-Wasserbad wurden die Röhrchen zum Sedimentieren in den Kühlschrank gestellt. Nach vollständiger Sedimentation wurde die Hämolysse abgelesen und mit + bis ++++ beurteilt. Als positive Kontrolle wurde in der einen Ebene das BSA und in der anderen das Serum durch Komplementpuffer ersetzt. Als negative Kontrolle wurde das Serum bzw. das BSA allein mit Komplement-Puffer vor Zusatz des hämolysierenden Systems inkubiert. Eine weitere Negativkontrolle war ein Ansatz der Seren, die den Kaninchen vor Immunisierung entnommen worden waren.

Passiver Hämagglutinationstest (12, 39, 75)

24 Std. im Kühlschrank aufbewahrte Hammelerythrozyten wurden 3 x in Kochsalzlösung (pH 7,2) gewaschen und in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2) als 5%ige Suspension aufgeschwemmt. Zu einem Volumen Hammelerythrozytensuspension wurde eine gleiche Menge 1 : 20 000 verdünnte Tanninlösung (Merck) zugefügt,

gemischt und für 10 bis 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2) wurde das Erythrozytensediment mit phys. NaCl-Lösung zum Ausgangsvolumen resuspendiert. Zu 1 Volumen dieser Hammelerythrozytensuspension wurden 4 Volumen einer 0,1%igen BSA-Lösung (in Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (pH 6,4)) zugefügt, gemischt und 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Sediment einmal in Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung bei pH 7,2 und einmal in 1 : 100 verdünntem normalen bei 56°C inaktivierten Kaninchenserum gewaschen. Dann wurden die Hammelerythrozyten zum Ausgangsvolumen in 1 : 3 verdünntem normalen bei 56°C inaktivierten Kaninchenserum resuspendiert. Von den zu untersuchenden Seren wurde eine geometrische Verdünnungsreihe in Röhrchen (9 x 68 mm) mit rundem Boden bis 1 : 200 000 hergestellt, als Verdünnungsmittel diente eine 1 : 100 verdünnte Lösung normalen Kaninchensserums. Zu je 0,2 ml verdünntem Serum wurden 0,1 ml der mit BSA beladenen Hammelerythrozyten zugefügt. Der Ansatz wurde geschüttelt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Abgelesen wurde mit bloßem Auge und die Ablagerungsart der Erythrozyten am Röhrchenboden mit 0 - 4 Kreuzen bewertet.

Als Negativkontrollen diente folgender Ansatz:

1. beladene Hammelerythrozyten plus normales Kaninchenserum
2. unbehandelte Hammelerythrozyten plus zu untersuchendes Serum
3. allein mit Tanninsäure behandelte Hammelerythrozyten plus zu untersuchendes Serum
4. allein mit Tanninsäure behandelte Hammelerythrozyten plus normales Kaninchenserum.

Radioimmunelektrophorese (99, 100)

Es wurde die Immunelektrophoreseausrüstung von LKB (6800A) benutzt. Ein 2%iges Agargel wurde in Veronalpuffer (pH 8,3) hergestellt und ca. 3 ml auf die Objektträger ausgegossen, so daß eine 1,5 mm hohe Agarschicht entstand. Mit dem Gelschneider wurde ein 65 mm langer und 1 mm breiter Kanal und im Abstand von 4,5 mm in der Mitte des Objektträgers zwei Löcher (Durchmesser 1 mm) eingeschnitten. Die Löcher wurden ausgesaugt und mit dem zu untersuchenden Serum bis zum Rand gefüllt. Es wurde eine Spannung von 250 Volt angelegt und die Elektrophorese nach 110 Minuten beendet.

Danach wurde auch der Kanal ausgesaugt und Antikaninchenserum (vom Esel - Behringwerke) bzw. Antikaninchen- γ -Globulin (von der Ziege - Fa. Behringwerke) eingefüllt. Nach 24stündigem Aufenthalt in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger 24 Stunden in phys. Kochsalzlösung gewaschen. Nach 6 Stunden wurde die Kochsalzlösung erneuert. Nach Aussaugen des Kanals wurde markiertes Albumin eingefüllt und die Objektträger 24 Stunden in einer feuchten Kammer belassen. Danach erneute Waschung in phys. Kochsalzlösung für 24 Stunden mit einem Kochsalzwechsel. Anschließend 1 Stunde Waschung in Aqua dest., Trocknung im warmen Luftstrom und Färbung mit Amidoschwarz. Zur Radiographie wurde ein Filmstreifen (Strukturix G 10 / GEVAERT) aufgelegt und sieben Tage in der Dunkelkammer belassen: anschließend Entwicklung des Filmes.

Albuminmarkierung (36)

1,0 ml J^{131} (JBS 3 der Firma Buchler/Braunschweig) wurden zusammen mit 0,075 ml einer 0,5 M NaOH-Lösung und 0,075 ml Boratpuffer (0,4 M H_3BO_3 + 0,32 M NaCl mit NaOH auf pH 8 eingestellt) in eine Spritze aufgesogen und dazu 0,15 ml einer 0,005 M JCl-Lösung aspiriert, kurz geschüttelt und in 1 ml einer 1,25%igen Albuminlösung (12,5 mg BSA trocken "reinst" -Behringwerke- gelöst in 1 ml einer 0,2 M H_3BO_3 + 0,16 M NaCl-Lösung), die mit einem Magnetrührer gerührt wurde, eingespritzt.

Nach etwa 10 Minuten wurde der gesamte Ansatz auf eine Säule aufgetragen, die 26 cm hoch, 2 cm im Durchmesser und mit Sephadex G 10 (Pharmacia) in 0,15 M NaCl gefüllt war. Auf diese Weise wurde das freie Jod 131 von der Albuminfraktion getrennt. Die Albuminfraktion betrug etwa 10 ml und wurde mit 0,15 M NaCl-Lösung auf 12,5 ml aufgefüllt, so daß sich eine 0,12%ige jodmarkierte Albuminlösung ergab.

Säulenchromatographie (42, 98)

Es wurde eine Säule (Innenmaße 2,5 x 50 cm) mit Bio-Gel A-1,5 m (8 % Agarose - Gel) Mesh Size 100-200 (Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) gefüllt. Als Puffer diente ein Tris-HCl-Puffer in 1 M NaCl pH 8. Die Säule wurde im Kühlraum (6°C) aufgestellt. Es wurde jeweils 1 ml Serum auf das Gelbett aufgetragen und mit einer Tropfgeschwindigkeit von 21 Tr./Min. eluiert. Das Eluat wurde im Uvicord II (LKB) bei 254 nm gemessen, die Trans-

mission auf einem Schreiber kontinuierlich registriert und in Einzelfractionen von je 3 ml im RadiRac (LKB) gesammelt. Es wurde eine zweigipflige Kurve erhalten. Die dem ersten Gipfel entsprechenden Einzelfractionen wurden zu einer, die dem zweiten Gipfel entsprechenden Einzelfractionen zu drei Fractionen vereinigt.

Einengung und Dialyse

Die vier aus der Säulenchromatographie erhaltenen Fractionen wurden in einem Rotationsverdampfer, der über eine Kühlfalle (Trocken-Alkohol-Gemisch) an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, auf 2 - 3 ml Volumen eingeengt. Zur Entfernung der ausgefallenen Salze wurde das Material durch eine Filterspritze gepreßt. Zur Herabsetzung der Elektrolytkonzentration wurden die Fractionen dreimal 1 Stunde gegen bidestilliertes Wasser und zwei Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung in einem Gefäß mit Rührvorrichtung dialysiert.

Ultrazentrifugation

Das Untersuchungsmaterial wurde in einer analytischen Ultrazentrifuge Modell E (Fa. Beckman Instr.) bei 59.780 U/Min. in einer Standardzelle zentrifugiert.

Die Aufnahmen erfolgten bei einem Schlierenwinkel von 75°.

ERGEBNISSE

Nach Beendigung der Immunisierung wurden von allen Tieren die zu verschiedenen Zeiten entnommenen Seren (siehe Immunisierungstabelle) auf praecipitierende Antikörper im Geldiffusionstest nach Ouchterlony untersucht. Wie aus Abb. 1 zu ersehen ist, wurde in das mittlere Loch das Antigen (BSA) gefüllt und in die umgebende Rosette die Seren in der Reihenfolge ihrer zeitlichen Entnahme angeordnet. Es ist zu erkennen, wie die Stärke der Praecipitationslinien im Laufe der Immunisierung zunimmt.

Bei der "oral-Gruppe", wie bei der "oral-oral-Gruppe" fanden sich keine Praecipitationslinien. Ebenso konnten bei den oral-parenteral immunisierten Gruppen nach der anfänglichen oralen Immunisierung

keine Praecipitationslinien nachgewiesen werden. Diese traten erst nach den parenteralen Boosterungen auf. Dagegen fanden sich solche bei einigen der primär parenteral immunisierten Tiere schon nach der ersten Gabe des Antigens.

Zur quantitativen Erfassung dieser Antikörper wurde der passive Hämagglutinationstest nach BOYDEN verwendet, nachdem sich herausgestellt hatte, daß für eine quantitative Bestimmung im Mikro-Kjeldahl die Antikörperkonzentration in den Seren, die nach der Immunisierung und vor der Zweitgabe des Antigens gewonnen worden waren, zu gering war.

Die Bestimmung im passiven Hämagglutinationstest bot sich an, weil die Empfindlichkeit dieses Testes bei 0,003 bis 0,006 μg Antikörper N/ml gegenüber 10 bis 20 μg Antikörper N/ml im Mikro-Kjeldahl und 6 μg Antikörper N/ml in der Ouchterlony-Methode (82) liegt, so daß auch im Ouchterlonytest nicht erfaßbare Antikörper nachgewiesen werden konnten. So stellte sich heraus, daß Antikörpertiter im passiven Hämagglutinationstest, die unter 1 : 1600 bis 1 : 3200 lagen, keine Praecipitationslinien im Ouchterlonytest ergaben.

Die Ergebnisse des passiven Hämagglutinationstestes sind in den Abbildungen 2 bis 6 für die einzelnen Versuchs- und ihre Kontrollgruppen zusammengestellt. Abb. 2 zeigt die "oral-Gruppe" im Vergleich zur "oral-oral-Gruppe". Es ist ersichtlich, daß es bei der "oral-oral-Gruppe" durch erneute Antigenzufuhr zu einer Steigerung des Antikörpertiters kommt, während bei der "oral-Gruppe" nach der einmaligen Antigengabe der höchste Antikörpertiter am 17. Tag gemessen wurde, der dann langsam abfällt. Der relativ hohe Antikörpertiter der "oral-Gruppe" am 17. Tag gegenüber der Vergleichsgruppe kann nur als individuelle Schwankung der Immunantwort verstanden werden.

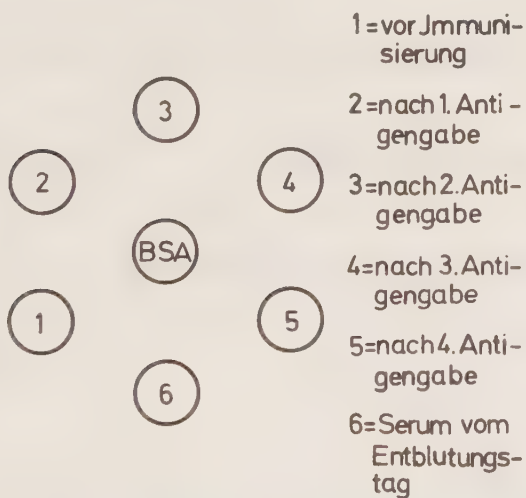
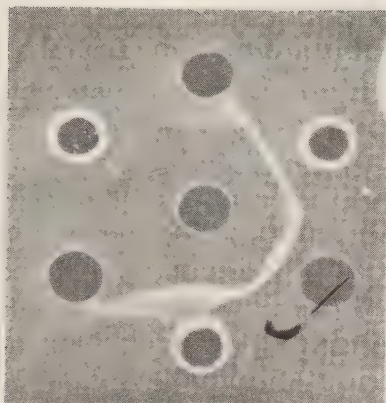


Abb. 1: Geldiffusionstest. Praecipitierende Antikörper im Laufe der Primär-, Sekundär- und Hyperimmunantwort bei einem Tier, dem BSA i. m. verabreicht wurde.

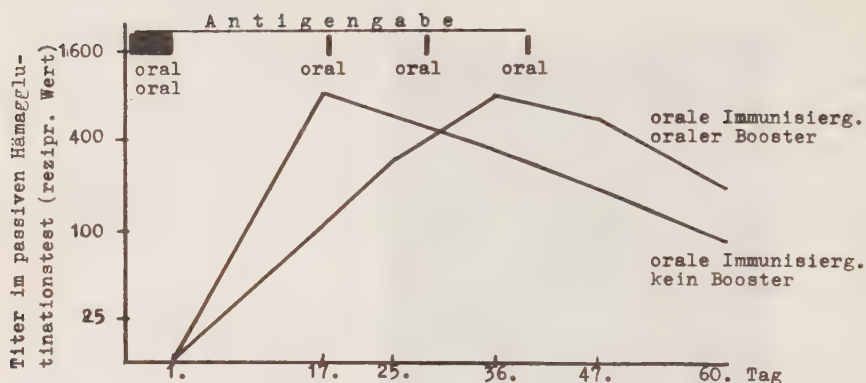


Abb. 2: Titerverlauf im passiven Hämagglutinationstest der "oral-Gruppe" und der "oral-oral-Gruppe".

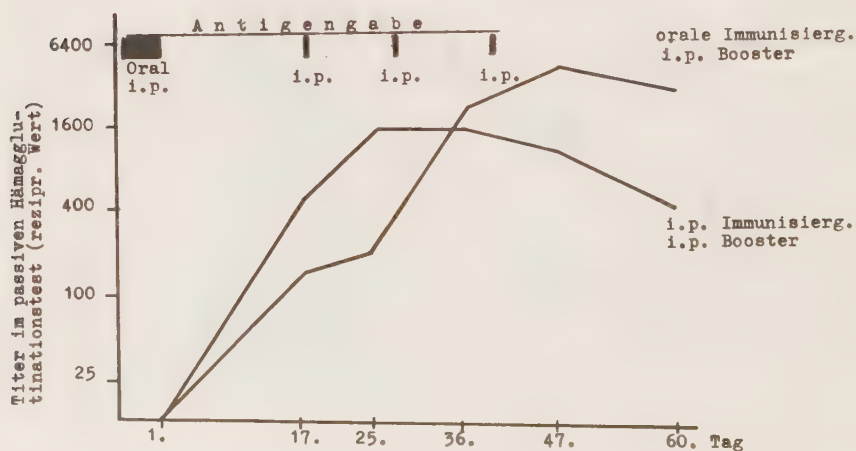


Abb. 3: Titerverlauf im passiven Hämagglutinationstest der "oral-i. p.-Gruppe" und der "i. p.-i. p.-Gruppe".

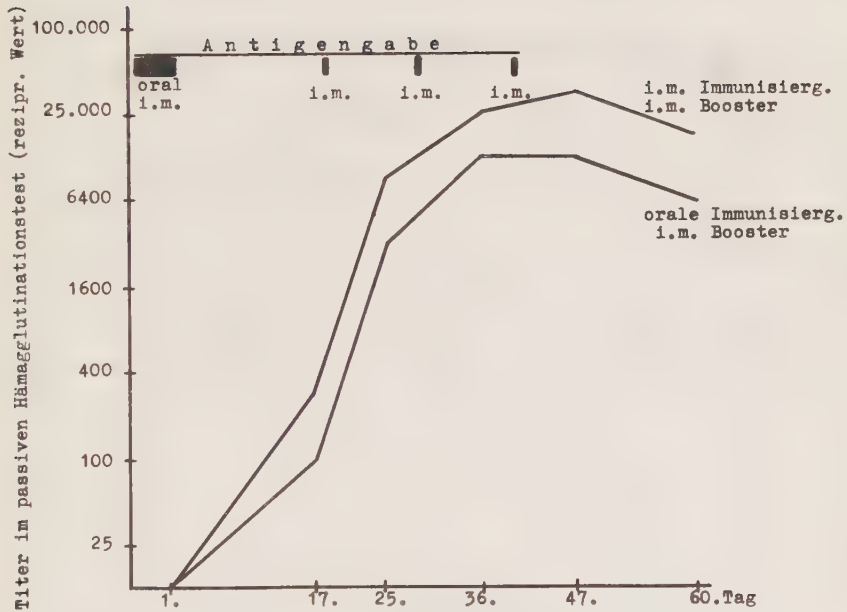


Abb. 4: Titerverlauf im passiven Hämagglutinationstest
der "i. m.-i. m.-Gruppe" und der "oral-i. m.-Gruppe".

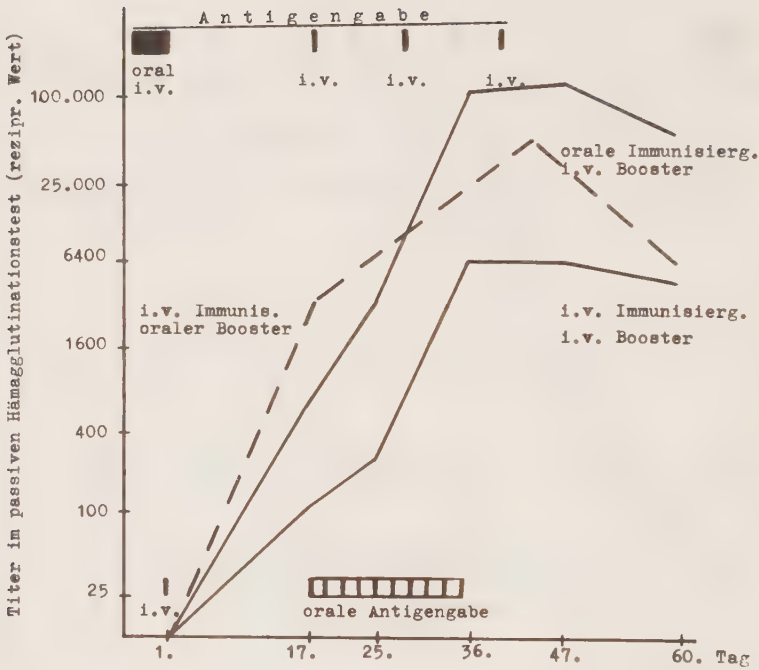


Abb. 5: Titerverlauf im passiven Hämagglutinationstest der "oral-i. v.-Gruppe", der "i. v.-i. v.-Gruppe" und der "i. v.-oral-Gruppe" (unterbrochene Linie).

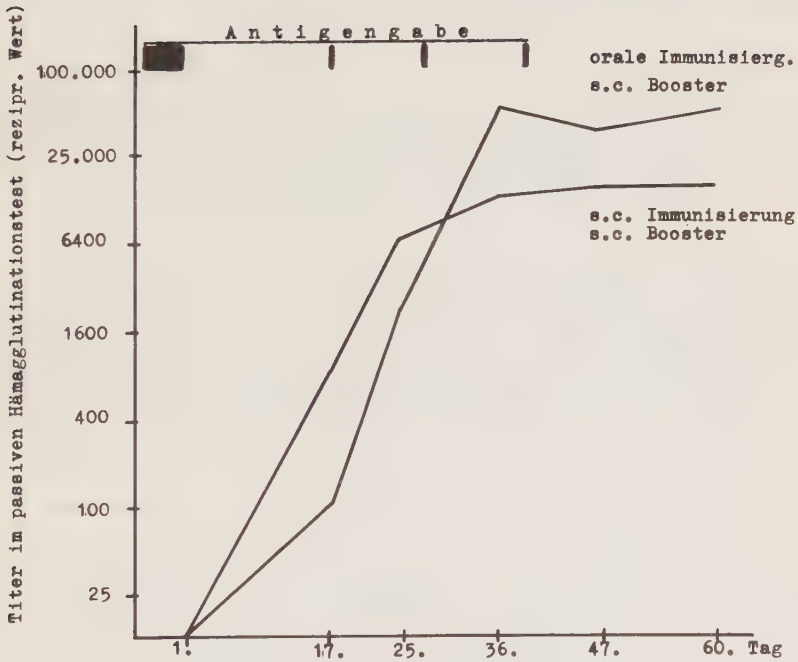


Abb. 6: Titerverlauf im passiven Hämagglutinationstest der "oral-s. c.-Gruppe" und der s. c.-s. c.-Gruppe".

Wir finden also eine Sekundär- und Hyperimmunantwort nach oraler Immunisierung und oraler Boosterung.

Daß sich, wie nach diesem Ergebnis zu erwarten, nach oraler Immunisierung durch erneute parenterale Antigenezufuhr typische Sekundär- und Hyperimmunantworten erzeugen lassen, zeigen die Abbildungen 3 bis 6.

Die Titerkurven zeigen einen den Kontrollen ähnlichen Verlauf, und auch der Weg der parenteralen Antigenezufuhr wirkt sich nur in quantitativen Unterschieden aus. Während nach i. m., i. v. und s. c. Antigenezufuhr annähernd gleich hohe Antikörpertiter erreicht werden, liegen die nach i. p. Antigenezufuhr niedriger.

Ein deutlicher Unterschied der Titerhöhen besteht zwischen der "oral-Gruppe" bzw. "oral-oral-Gruppe" (Abb. 2) und den "oral-parenteral-Gruppen" (Abb. 3 bis 6). Hier handelt es sich offenbar um einen Dosiseffekt, d. h. die geringen Titerhöhen bei der "oral-oral-Gruppe" können durch zu geringe Antigenezufuhr erklärt werden. Dies beweist Abb. 5, in der die unterbrochene Linie den Titerverlauf bei der "i. v.-oral-Gruppe" zeigt. Obwohl auch hier nach i. v. Immunisierung die Titerhöhe eine ähnliche Höhe wie nach oraler Immunisierung erreicht, werden durch orale Boosterung ebenso hohe Titer wie nach parenteraler Boosterung erhalten. Im Unterschied zu den Gruppen der Abbildung 2 wurde hier jedoch eine zehnfache Boosterdosis angewendet, die in 10 Einzeldosen (10 x 250 mg) im Abstand von jeweils zwei Tagen verabreicht wurde, während die "oral-oral-Gruppe" jeweils einmal zwischen den Blutentnahmen 250 mg BSA erhielten.

Zur Prüfung der Frage, ob es sich um komplementbindende Antikörper handelt, wurde die Komplementbindungsreaktion durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Tab. 2: Alle Seren, die nach Beginn der Immunisierung gewonnen werden, binden Komplement; die Titerhöhe ist abhängig von dem Antikörpertiter, wie ein Vergleich der Abb. 2 bis 6 mit Tab. 2 zeigt.

Zur Beantwortung der Frage, welcher Immunglobulinklasse die Antikörper zuzuordnen sind, wurde die Radioimmunelektrophorese angewendet. Diese Methode wurde gewählt, erstens, da sich bereits

im Ouchterlony- und passiven Hämagglutinationstest herausgestellt hatte, daß die Seren mit niedrigen Antikörpertitern keine Praecipitationslinien ergaben und zweitens, weil die Möglichkeit bestand, daß neben den praecipitierenden Antikörpern nicht praecipitierende Antikörper vorliegen könnten, so daß diese dem Nachweis in der direkten Immunelektrophorese entgehen würden.

Zu folgenden Zeiten gewonnene Seren wurden untersucht:

1. vor Immunisierung (negative Kontrollen)
2. nach Immunisierung
3. nach der Zweitgabe des Antigens
4. nach der Drittgabe des Antigens (mit Ausnahme der i. v.-oral-Gruppe).

Abb. 7 und 8 zeigen zwei Beispiele: Die radioaktiven Antigen bindenden Antikörper liegen in der IgG-Linie, und zwar sowohl nach oraler wie auch nach parenteraler Immunisierung. Einige Seren zeigten unabhängig vom Immunisierungsweg Spuren von IgM, die im Laufe der Sekundär- und Hyperimmunantwort verschwinden.

		Tar	SERUMVERDÜNNUNG					
		Nr.	konz.	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
orale Immunisie- rung	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	++	+	±	-	-	-	-
	25.	++	±	-	-	-	-	-
	36.	+	-	-	-	-	-	-
	47.	+	-	-	-	-	-	-
	60.	±	-	-	-	-	-	-
orale Immunisie- rung oral Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	++	+	-	-	-	-	-
	25.	++	++	-	-	-	-	-
	36.	++	++	±	-	-	-	-
	47.	++	+	±	-	-	-	-
	60.	++	++	±	-	-	-	-
orale Immunisie- rung i.p. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	+++	++	+	-	-	-	-
	25.	+++	++	+	-	-	-	-
	36.	+++	++	±	±	-	-	-
	47.	+++	++	±	-	-	-	-
	60.	++	+	-	-	-	-	-
i.p. Immunisie- rung i.p. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	+	±	-	-	-	-	-
	25.	+++	+	±	-	-	-	-
	36.	++++	++++	+++	++	-	-	-
	47.	+++	++	+	±	-	-	-
	60.	++	±	-	-	-	-	-
orale Immunisie- rung i.m. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	+	±	-	-	-	-	-
	25.	+++	+++	++	+	-	-	-
	36.	+++	+++	++	+	-	-	-
	47.	+++	+++	+	-	-	-	-
	60.	+	+	-	-	-	-	-
i.m. Immunisie- rung i.m. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	+++	+++	+	-	-	-	-
	25.	++++	++++	+++	++	+	-	-
	36.	++++	++++	++++	+++	++	+	+
	47.	++++	++++	++++	+++	+++	++	++
	60.	++++	++++	+++	+++	+	-	-
orale Immunisie- rung i.v. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	++	-	-	-	-	-	-
	25.	+++	++	±	±	-	-	-
	36.	+++	++	+	±	-	-	-
	47.	+++	+++	++	+	±	-	-
	60.	+++	+++	++	+	-	-	-
i.v. Immunisie- rung i.v. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	+++	++	+	-	-	-	-
	25.	+++	+++	++	+	±	-	-
	36.	++++	++++	+++	++	+	±	-
	47.	+++	+++	++	±	-	-	-
	60.	+++	++	+	-	-	-	-
orale Immunisie- rung s.c. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	++	+	-	-	-	-	-
	25.	+++	+++	++	+	±	-	-
	36.	+++	+++	++	++	+	±	-
	47.	+++	+++	+++	++	+	±	-
	60.	+++	+++	++	++	±	-	-
s.c. Immunisie- rung s.c. Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	+++	++	+	-	-	-	-
	25.	+++	+++	+++	++	+	-	-
	36.	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	47.	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
	60.	+++	+++	++	++	+	-	-
i.v. Immu- nisierung orale-Booster	vor	-	-	-	-	-	-	-
	17.	+++	++	±	-	-	-	-
	44.	+++	+++	++	++	+	-	-

Tabelle 2: Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion.

Für die einzelnen Versuchsgruppen ist die Stärke der Hämolysehemmung (+ bis +++) und die Verdünnungen, in der die Seren die Hämolyse hemmten, im Verlauf der Primär-, Sekundär- und Hyperimmunantwort eingetragen.

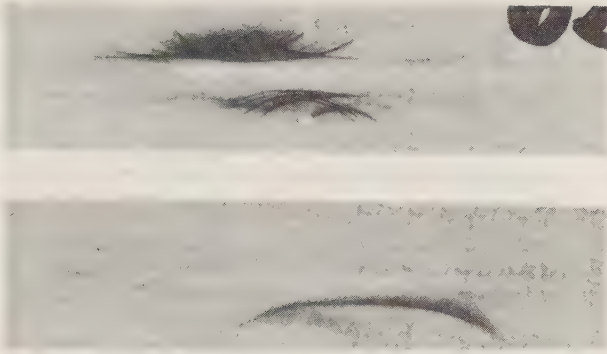


Abb. 7: oben: gefärbtes Immunelektrophoresepräparat,
unten: aufgelegter Film nach 7 Tagen. In das obere Loch
wurde das Serum des Tieres vor Immunisierung ein-
gefüllt, in das untere nach oraler Immunisierung.

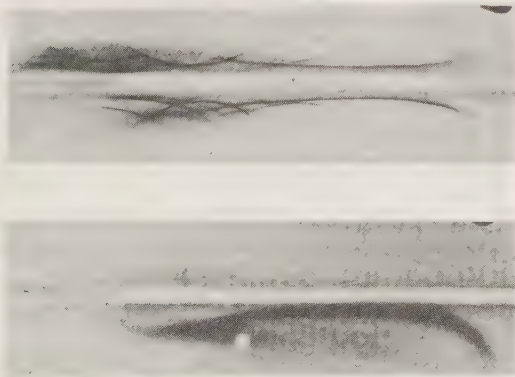


Abb. 8: oben: gefärbtes Immunelektrophoresepräparat,
unten: aufgelegter Film nach 7 Tagen. In das obere
Loch wurde das Serum des Tieres vor Immunisierung
eingefüllt, in das untere nach parenteraler Immauni-
sierung.

Ka- nin- chen Nr.	Immunisie- rung	Immun- globulin	1. Booster	Immun- globulin	2. Booster	Immun- globulin
		17. Tag		25. Tag		36. Tag
412	oral	IgG		IgG		IgG
413		IgG		IgG		IgG
430	oral	-	oral	-	oral	-
431		IgG		IgG		IgG
432		IgG		IgG		IgG
433		IgG		IgG		IgG
414	oral	IgG	i.p.	IgG	i.p.	IgG
417		IgG		IgG		IgG
418		-		-		IgG
434	i.p.	IgG	i.p.	IgG	i.p.	IgG
437		IgG		IgG		IgG
419	oral	IgG	i.m.	IgG	i.m.	IgG
420		IgG		IgG		IgG
421		IgG IgM		IgG		IgG
438	i.m.	IgG	i.m.	IgG	i.m.	IgG
439		IgG		IgG		IgG
440		IgG IgM		IgG		IgG
441		IgG		IgG		IgG
422	oral	IgG	i.v.	IgG	i.v.	IgG
423		IgG		IgG		IgG
424		IgG IgM?		IgG		IgG
452	i.v.	IgG	i.v.	IgG	i.v.	IgG
453		-		-		-
454		IgG		IgG		IgG
455		IgG		IgG		IgG
426	oral	IgG	s.c.	IgG	s.c.	IgG
427		-		IgG		IgG
428		-		IgG		IgG
429		IgG IgM		IgG		IgG
456	s.c.	IgG IgM	s.c.	IgG IgM?	s.c.	IgG
457		IgG		IgG		IgG
458		-		-		-
459	i.v.	IgG	oral 10 x	44. Tag		
460		IgG		IgG		

Tabelle 3: Immunglobulinklasse der Antikörper,
die nach Erst-, Zweit- und Drittgabe
von BSA gefunden wurden.

Jede Bestimmung wurde mindestens zweimal vorgenommen und mit Normalseren (vor Immunisierung entnommene Seren) verglichen, um unspezifische Antigenbindungen auszuschließen.

Die Ergebnisse für alle Versuchstiere sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Um zu klären, ob es sich bei den radioimmunelektrophoretisch dargestellten Linien tatsächlich um IgG bzw. IgM handelt, wurden einzelne Seren in einer Bio-Gel A Chromatographiesäule in zwei Fraktionen aufgetrennt. In Abb. 9 ist die Auftrennungskurve dargestellt.

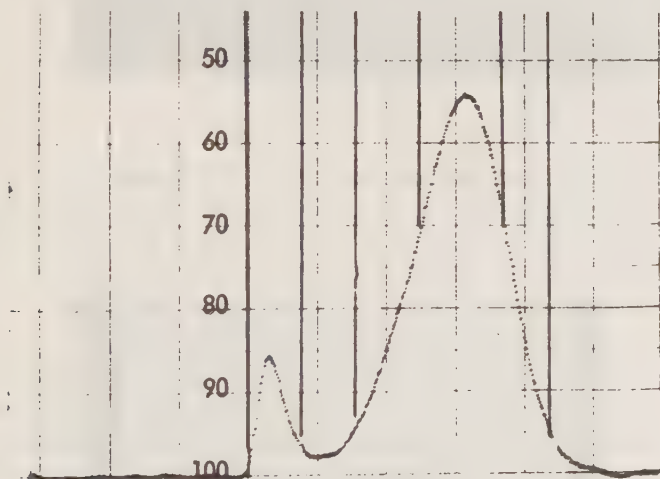


Abb. 9:

Die den beiden Gipfeln entsprechenden Einzelfractionen wurden auf ihre Sedimentationskonstante untersucht. Der erste kleine Gipfel enthält Proteine von $s_{c \text{ app}} = 17,4S$, der zweite von $s_{c \text{ app}} = 9,0S$ (Abb. 10, 11). Im zweiten Gipfel befindet sich eine geringe Verunreinigung durch höher molekulare Substanzen (siehe Pfeil in Abb. 11). Die so nach der Sedimentationskonstante charakterisierten Fractionen wurden nun erneut in der Radioimmunelektrophorese und im Radiogeldiffusionstest untersucht und mit demselben, aber nicht aufgetrennten Serum verglichen. Es zeigte sich, daß die schon vorher als IgG bezeichnete Linie der 9,0S Fraction, und die in einigen

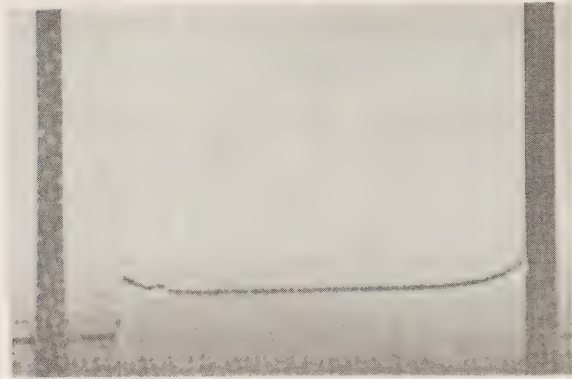


Abb. 10: Schlierendiagramm des ersten kleineren Gipfels.

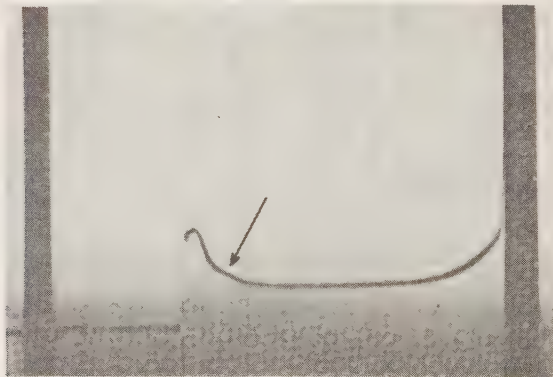


Abb. 11: Schlierendiagramm des zweiten größeren Gipfels. Der Pfeil zeigt auf eine größermolekulare Verunreinigung.

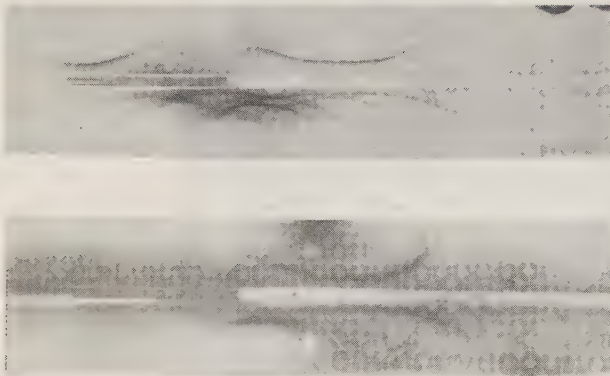


Abb. 12: Radioimmunelektrophorese: der 9,0S Fraktion
(oberes Loch) gegenüber dem unaufgetrennten Serum
(unteres Loch). Oben gefärbtes Präparat, unten
Film nach 7 Tagen.

Seren zusätzlich aufgetretene IgM Linie der 17,4S Fraktion zugeordnet werden konnten (Abb. 12 u. 13). Es ist also erlaubt, nach dem immunelektrophoretischen Verhalten und der Sedimentationskonstante von IgG bzw. IgM zu sprechen.

Zusammenfassend können die anfangs gestellten Fragen wie folgt beantwortet werden:

1. Nach oraler Immunisierung läßt sich durch erneute orale Antigengabe eine Sekundär- und Hyperimmunantwort erzeugen.
2. Oral immunisierte Tiere reagieren auf erneute parenterale Antigenzufuhr mit einer typischen Sekundär- und Hyperimmunantwort.
3. Es bestehen keine wesentlichen Unterschiede in der Immunantwort nach parenteraler Zweitgabe des Antigens auf den verschiedenen Wegen (s. c., i. p., i. v., i. m.).

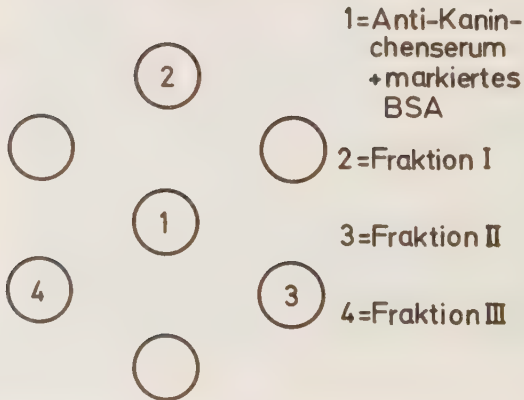
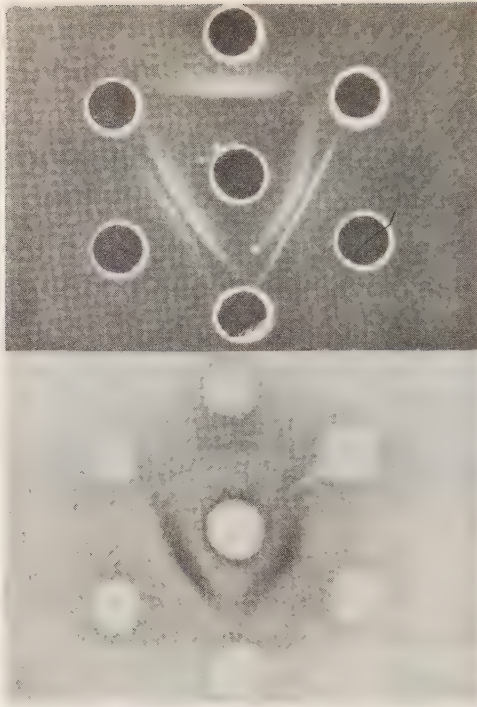


Abb. 13: Radiogeldiffusion. Bindung von J^{131} markiertem BSA an die Praecipitationslinien, die die säulenchromatographischen Fraktionen des Serums 456 mit Antikaninchenserum ergaben. Starke Antigenbindung in den Fraktionen II und III (IgG) und schwache Bindung in Fraktion I (IgM). Oben: Netivpräparat. Unten: Aufgelegter Film nach sieben Tagen.

4. Nach i. v. Immunisierung und oraler Zweitgabe des Antigens kommt es zu einer typischen Sekundärantwort.
5. Um einen annähernd gleichen Antikörpertiter nach Immunisierung auf oralem Wege wie nach parenteraler Antigenzufuhr zu erhalten, mußten 250 mg BSA 10 mal in Abständen von zwei Tagen oral zugeführt werden gegenüber einer einmaligen parenteralen Antigenzufuhr von 10 mg.
6. Es fanden sich praecipitierende, komplementbindende Antikörper.
7. Nach oraler Immunisierung wie nach parenteraler Immunisierung zeigten sich am 17. Tag vorwiegend IgG-Antikörper, bei einigen Seren noch Spuren von IgM. Nach Boosterung fanden sich in allen Seren nur noch IgG-Antikörper.
8. Die Sekundär- und Hyperimmunantwort nach oraler Immunisierung unterscheidet sich nicht von der nach parenteraler Immunisierung.

DISKUSSION

Nach parenteraler Antigenzufuhr erreicht das Antigen über die Blutbahn oder die Lymphwege direkt die immunkompetenten Zellen. Die Immunantwort setzt bereits nach wenigen Stunden ein (85). Makrophagen, die zuerst das Antigen aufnehmen, bilden eine informative RNS, die auf lymphatische Zellen übertragen wird und dort die Bildung der spezifischen Antikörper induziert. Zuerst kommt es zur Bildung von IgM-Antikörpern (5, 6, 9, 70, 84, 85, 90, 91). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß gleichzeitig auch schon IgG-Antikörper entstehen können (3, 27, 28, 30). Die IgM-Antikörper werden rasch durch IgG-Antikörper abgelöst (52). Das Maximum des Antikörpertiters wird am 6. - 8. Tag nach der primären Antigengabe erreicht. Von da an nimmt die Antikörperproduktion immer weiter bis zu 1 % des maximalen Wertes, nach weiteren 7 - 8 Tagen ab (20). Möglicherweise wird die Antikörperproduktion bei der Primärantwort nach der Elimination des Antigens nicht weiter fortgesetzt (19). Für die Primärantwort nach oralen Immunisierung sind ähnliche Verhältnisse von ROTHBERG u.a. (69) beobachtet worden. Zwischen dem 8. - 11. Tag nach Beginn der oralen Immunisierung mit BSA wurden Antikörper im Serum nachweisbar. Sie konnten den beiden Immunglobulinklassen Ig₁ und Ig₂ zugeordnet werden. Die IgM-Antikörper wurden bis zum 14. Tag nachgewiesen, danach fanden sich nur noch IgG-Antikörper, deren Titer weiterhin anstieg.

Die Befunde von ROTHBERG sind wichtig, weil sie zeigen, daß die Kinetik der Primärantwort nach oraler Immunisierung, soweit sie sich in der Qualität der Antikörper im Serum widerspiegelt, sich nicht von der nach parenteraler Immunisierung unterscheidet. Eine möglicherweise in der Darmwand stattfindende Immunreaktion auf Nahrungsproteine findet zumindest keinen Ausdruck im Antikörperspektrum des Serums, d.h. Antigene, die über den Darm in den Kreislauf gelangen, bewirken die gleiche Immunreaktion wie parenteral zugeführtes Antigen. Die Frage, warum Antikörper gegen Nahrungsproteine relativ selten nachgewiesen werden, wird später diskutiert.

In meiner Arbeit sollte untersucht werden, ob die Sekundär- und Hyperimmunantwort nach oraler Immunisierung und oraler bzw. parenteraler Boosterung sich von der nach parenteraler Immunisierung in ihrer Kinetik und in der Qualität der Antikörper, die im Serum nachweisbar werden, unterscheidet.

Die Sekundärantwort nach parenteraler Immunisierung zeichnet sich dadurch aus, daß es zu einem rascheren Beginn der Antikörperbildung kommt (18 - 20, 83), daß bei Antigenen von Proteincharakter höhere Antikörpertiter als bei der Primärantwort entstehen (18, 20, 51), daß bereits nach 4 - 6 Tagen das Maximum der Antikörperbildung erreicht wird (20) und daß der Titerabfall langsamer geht (19). Dies trifft allerdings nicht für alle Antigene zu (51). Bei der Sekundärantwort wird vorwiegend die IgG-Produktion stimuliert (27, 92), aber auch IgM-Antikörper können produziert werden (51, 58). Die Kinetik der Hyperimmunantwort gleicht der sekundären Immunreaktion (20). Die schnelle und starke Antikörperbildung bei der Sekundärantwort wird dadurch erklärt, daß die Information zur Antikörperbildung (RNS) gegen das spezifische Antigen noch in den sogenannten "memory" Zellen gespeichert liegt und nicht erst der Weg der Information wie bei der Primärantwort über Makrophagen gehen muß. Die "memory" Zellen müssen an ihren Oberflächen besondere "Sensoren" tragen, die das Antigen "wiedererkennen" und sofort mit einer starken Antikörperbildung auf den spezifischen Reiz (Antigen) reagieren können (79).

Wenn nun bei der Primärantwort nach oraler Immunisierung die gleiche Kinetik eingehalten worden ist wie nach parenteraler Immunisierung, müßten ebenso "memory" Zellen vorhanden sein, die bei

neuem Antigenstimulus mit der raschen und starken Antikörperbildung beginnen könnten.

Daß dies tatsächlich der Fall ist, zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung. Auch nach oraler Immunisierung müssen solche schnell "anspringende" Zellen, die nicht durch den Umweg über den Makrophagen die Information zur Antikörperbildung erhalten, vorhanden sein. Den Ausdruck dieser Reaktion finden wir in dem steilen und schnellen Anstieg der Antikörpertiter im Serum, wenn das Antigen erneut parenteral zugeführt wurde.

Qualitativ konnten diese Antikörper (Radioimmunelektrophorese, Ultrazentrifugation, Radiogeldiffusion) der Immunglobulinklasse IgG zugeordnet werden, was ebenfalls typisch für die sekundäre Immunreaktion ist.

Daß nach parenteraler Zweitgabe des Antigens (i. v.-oral-Gruppe) eine typische sekundäre Immunreaktion ausgelöst wurde, verwundert nicht, da hier das immunologische Gedächtnis auf konventionellem parenteralem Wege erzeugt worden war, und nun nur dafür gesorgt werden mußte, daß genügend Antigen bei der Boosterung auf oralem Wege durch den Darm den Kreislauf erreichte.

Schwieriger sind die Befunde nach oraler Immunisierung und oraler Boosterung zu deuten. Daß unverändert in den Kreislauf gelangtes Antigen eine typische primäre und sekundäre Immunreaktion auslöst, ist oben gesagt worden. Was geschieht aber lokal in der Darmwand, wenn das Antigen diese passiert? Die Antikörpersynthese in den Schleimhäuten von Nase- Rachenraum (74, 65, 89), in Drüsengewebe (38, 13, 14, 89) und in der Darmwand (16, 29, 66, 88) ist durch viele Befunde belegt worden. Dabei kommt dem IgA eine besondere Bedeutung zu, da dieses in Sekreten in hohen Konzentrationen gefunden wird und sich vom IgA des Serums im Molekulargewicht und antigenen Determinanten unterscheidet (89). Eine lokal in den Schleimhäuten abgelaufene Immunantwort spiegelt sich aber offenbar, wie unsere Versuche zeigen, weder quantitativ noch qualitativ im Immunglobulinspektrum des Serums wider. Es könnte aber sein, daß dieser Mechanismus als lokale Antwort bei erneuter oraler Antigengabe trotzdem eine Rolle spielt, und zwar in dem Sinne, daß das oral zugeführte Antigen schon lokal eine Antigen-Antikörperreaktion eingeht und für die Induzierung einer sekundären Immunantwort nicht mehr in den Kreislauf gelangt. Die oral

immunisierten Tiere zeigten nach erneuter oraler Antigengabe einen Antikörpertiteranstieg im Serum, der allerdings deutlich geringer war als der nach parenteraler Zweitgabe des Antigens. Es muß aber beachtet werden, daß die Antigendosis bei der oralen Boosterung nur ein Zehntel der Dosis betrug, die insgesamt zur primären oralen Immunisierung verwendet wurde. Insofern läßt sich nicht entscheiden wie weit eine lokale Immunität hier eine Rolle spielt, obwohl der erneute Titeranstieg zeigt, daß zumindest ein kleiner Teil des Antigens an die "memory" Zellen gelangt sein muß. Dabei handelte es sich ebenfalls ausschließlich um Antikörper vom IgG-Charakter, wie es typisch für die Sekundärantwort ist.

Es zeigt sich also auch hier, daß sich die sekundäre Immunreaktion nach oraler Immunisierung und oraler Boosterung qualitativ nicht von der nach parenteraler primärer Antigenzufuhr unterscheidet. Für die Hyperimmunantwort nach oraler Immunisierung konnten die gleichen Verhältnisse wie für die Sekundärantwort festgestellt werden, wie der Titerverlauf und die Bestimmung der Immunglobuline nach Dritt- und Viertgabe des Antigens zeigt.

Ein Widerspruch zu den Befunden ROTHBERG's u.a. (69) soll kurz erläutert werden.

Die Versuchsgruppe, die die Primärantwort nach oraler Immunisierung demonstriert (Abb. 2) zeigt vom 17. Tag (erste Antikörperbestimmung) an einen kontinuierlichen Abfall der Antikörpertiter im Serum. Dies entspricht der Primärantwort nach parenteraler Immunisierung. ROTHBERG u.a. hatte aber einen kontinuierlichen Anstieg der Antikörpertiter bis zum 80. Tag nach Beginn der oralen Immunisierung festgestellt. Dieser Widerspruch ist dadurch leicht erklärlich, daß ROTHBERG während der ganzen Versuchsdauer fortwährend BSA oral zuführte, hier also ein fließender Übergang zwischen Primär-, Sekundär- und Hyperimmunantwort besteht.

Am 17. Tag, also während der Primärantwort fanden sich in unseren Versuchen Spuren von IgM neben deutlich nachweisbarem IgG, während ROTHBERG schon am 14. Tag nach Beginn der oralen Immunisierung kein IgM mehr feststellen konnte. Wahrscheinlich spielt auch hier die ununterbrochene orale Antigenzufuhr eine Rolle.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß oral zugeführtes Antigen, wenn es einmal den Kreislauf erreicht hat, eine Immunreaktion wie nach parenteraler Immunisierung auslöst, und die möglicherweise lokal am Eintrittsort ausgelöste Immunreaktion keinen Einfluß auf die humorale Antikörperbildung nimmt. Die Kinetik der Immunantwort läuft in gleicher Weise ab, als wenn das Antigen primär parenteral gegeben worden wäre. Wir möchten bei der oralen Immunisierung zwei parallel ablaufende Immunreaktionen annehmen, eine lokale, die bemüht ist, schon am Eintrittsort des Antigens dieses unwirksam zu machen, und eine zweite, die wirksam werden kann, wenn dieser lokale Schutz nicht zur Abwehr des Antigens ausreicht. Wenn sich die Annahme dieses doppelten immunologischen Schutzes durch weitere Befunde untermauern läßt, dann muß die dem Infektionsweg von Krankheitskeimen nachgeahmte Immunisierungsweise als die wirksamste anerkannt werden.

Ein oft vorgebrachter Einwand bei der Diskussion der oralen Immunisierung ist der, daß es doch zur Antikörperbildung gegen die verschiedensten Nahrungsproteine kommen müßte, wenn Proteine ungehindert in den Kreislauf gelangen und dort wie parenteral zugeführte Antigene die immunkompetenten Zellen stimulieren. Daß dies möglich ist, beweist einmal mehr das Ergebnis dieser Arbeit. Dem steht aber die Tatsache gegenüber, daß nur selten bei Erwachsenen Antikörper gegen Nahrungsproteine gefunden werden. Dies könnte verschiedene Ursachen haben:

1. Die Nahrungsproteine könnten vollständig im Magendarmtrakt abgebaut werden, so daß keine antigenwirksamen Eiweißmoleküle mehr übrig bleiben, oder nicht verdaute Proteine vermögen vielleicht die Darmschleimhaut nicht zu passieren. Daß dies nicht der Fall ist, wurde schon in der Einleitung erwähnt. Einerseits werden die Nahrungsproteine am schlechtesten gegenüber Fett und Kohlehydraten abgebaut, liegen also am stärksten konzentriert und am längsten unverdaut im Darmlumen, andererseits ist der Nachweis von Nahrungsproteinen im Kreislauf mehrfach gelungen (31, 43, 64, 72, 95).

2. Die Proteine könnten bei der Zubereitung der Speisen durch Hitze so verändert werden, daß sie ihren Antigencharakter verlieren.

Für Albumin aus Rindfleisch konnten dies ROTHBERG und FARR (68) nachweisen. Anders ist dies natürlich bei Proteinen, die roh genossen werden. Dies betrifft besonders die Kuhmilch. Antikörper gegen Milchproteine sind tatsächlich sehr häufig nachgewiesen worden (4, 32, 33, 37, 43, 47, 55, 64, 67, 87).

3. Ein weiterer Grund könnte der sein, daß im Laufe der Kindheit lokal im Darm ein Schutzmechanismus aufgebaut wird, der verhindert, daß Nahrungsproteine in den Kreislauf gelangen. Dies ist meines Wissens für Nahrungsproteine noch nicht untersucht worden, muß aber als ein wichtiger Faktor in Betracht gezogen werden.

4. Die dauernde Zufuhr geringer Mengen des Antigens könnte eine Immuntoleranz erzeugen. Dies wurde bereits von RATNER und GRUEHL 1934 diskutiert (64). Für die Entwicklung einer Immuntoleranz sprechen neuerdings folgende Befunde:

Es wurde festgestellt, daß mit zunehmendem Alter immer weniger häufig Antikörper gegen Milchproteine vorkommen. Während bei Kindern bis zum 15. Lebensjahr Antikörper gegen Rinderalbumin und Laktalbumin bei 75 % nachgewiesen werden konnten, gelang dies bei Erwachsenen zwischen 16 und 40 Jahren nur noch in 25 % und bei Älteren nur noch bei 8 % (67). Dieser Befund allein könnte aber sowohl auf einem lokalen Schutz im Darm wie auch auf einer Immuntoleranz beruhen. Bei Personen jedoch, die regelmäßig Milch zu sich nahmen, aber keine Antikörper gegen Milchproteine in ihren Seren besaßen, gelang es weder durch orale noch durch parenterale Gabe von bovinem Serumalbumin eine Antikörperbildung zu stimulieren (45).

Dagegen konnte bei Personen, die bereits Antikörper gegen Laktalbumin besaßen, die Antikörperbildung durch orale wie durch parenterale BSA Gabe gesteigert werden. Bei einer Probandin, die nachweislich in den letzten 10 Jahren keine Milch zu sich genommen hatte und deshalb auch keine Antikörper gegen Rinderalbumin besaß, konnte durch orale Gabe von BSA eine starke Antikörperbildung erzielt werden.

Die Immuntoleranz gegen Nahrungsproteine ist nur dadurch möglich, daß kleinste Mengen des Antigens über lange Zeit angeboten werden. Dies darf als ein sinnvoller Mechanismus zum Schutz vor

pathogenen Immunphänomenen durch Nahrungsproteine betrachtet werden, und läßt uns verstehen, warum humorale Antikörper gegen Nahrungsproteine bei Erwachsenen relativ selten und mit zunehmendem Alter in abnehmender Zahl gefunden werden.

Für die orale Immunisierung als Impfmethode zur Erreichung einer Immunität gegen Infektionskrankheiten dürfte die Immuntoleranz aber keine Rolle spielen, da durch sinnvolle Dosierung des Impfstoffes eine solche unerwünschte Immuntoleranz (sie würde die Infektionsbereitschaft des Makroorganismus erhöhen) vermieden werden kann.

Ein wichtiger Faktor bei der Immunisierung ist die Antigenmenge. Für BSA wurde festgestellt, daß die kritische Schwelle für die Antikörperbildung nicht die totale Dosis des Antigens darstellt, sondern dessen Konzentration. Die Minimalmenge BSA, die zur Antikörperbildung bei Kaninchen gebraucht wird, liegt bei $6\mu\text{g}$ für den i. v. Weg und $0,05 - 0,1\mu\text{g}$ als Wasser in Öl-Emulsion auf s. c. Wege (25).

Es ist verständlich, daß viel größere Antigendosen für die orale Immunisierung benötigt werden, da nur geringe Anteile der gesamten Antigenmenge in den Kreislauf gelangen.

In unseren Versuchen konnten annähernd gleiche Antikörpertiter erzielt werden, wenn oral zehnmal 250 mg BSA gegeben wurden gegenüber einer einmaligen parenteralen Antigengabe von 10 mg. Allerdings wurden mit der oralen Zweit- und Mehrfachgabe von jeweils 250 mg BSA keine gleichstarken Sekundär- und Hyperimmunantworten wie nach parenteraler Boosterung erzielt.

Für die in den Kreislauf gelangte Antigenmenge dürfte aber ähnliches gelten wie für i. v. oder s. c. zugeführtes Antigen, d.h. auch für die orale Immunisierung ist die Antigenkonzentration entscheidend. Nach unseren Versuchen ist kein Vergleich über die Mengenverhältnisse der Antigendosen bei oraler und parenteraler Immunisierung möglich, da das Antigen oral in zehn Einzelportionen verabreicht und keine Bestimmungen der Antigenkonzentration im Serum vorgenommen wurden.

Als Nebenergebnis gestatten unsere Versuche einen Vergleich der Wirksamkeit von auf verschiedenen parenteralen Wegen zugeführtem

BSA auf die Bildung zirkulierender Antikörper. Über die Immunisierung nach Antigengabe auf verschiedenen Wegen liegen bisher zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vor. DRAPER und SÜSSDORF (21) fanden nach intraperitonealer Gabe von Schafererythrozyten die höchsten Antikörpertiter, während nach i. m. und s. c. Gabe niedrige Antikörpertiter entstanden. Auf dem i. v. Weg wurden mittelhohe Antikörpertiter erzielt. LESKOWITZ und WAKSMAN (46) berichteten, daß nach i. m. und s. c. Gabe von BSA die höchsten Antikörpertiter gefunden wurden, mittlere nach i. p. Gabe und die niedrigsten nach i. c. und i. v. Gabe. WEBSTER (97) konnte die höchsten Antikörpertiter gegen Influenza Virus nach i. v. Gabe feststellen, mittlere bei i. p. und die niedrigsten bei s. c. immunisierten Tieren. SCHELLING und SILVERMAN (71), die mit verschiedenen Antigenen (Ovalbumin, E. coli, Lipopolysaccharid und Antigenen von Haemonchus contortus) arbeiteten, fanden die i. v. Gabe am wirksamsten, gefolgt vom i. p. Weg. Die subkutane Antigengabe zusammen mit inkompletten Freund'schen Adjuvants war am wenigsten wirksam.

Wie aus Abb. 14 ersichtlich, ordnet sich nach unseren Ergebnissen die Reihenfolge der Wirksamkeit auf den vier verschiedenen Immunisierungswegen wie folgt: intramuskulär, subkutan (mit Freund'schen Adjuvants), intravenös und intraperitoneal. In diese Abbildung sind nur die parenteral immunisierten und parenteral geboosterten Versuchsgruppen einbezogen, da sich die oral immunisierten und parenteral geboosterten Versuchsgruppen wegen der hohen oralen Antigendosis für den Vergleich nicht eignen. Diese Befunde widersprechen den für BSA von LESKOWITZ (46) angeführten Daten bezüglich der i. p. und i. v. Antigengabe, wie oben ausgeführt. Eine Erklärung dafür ist schwer zu geben. Vielleicht spielt die individuelle Reaktionslage der Versuchstiere eine Rolle.

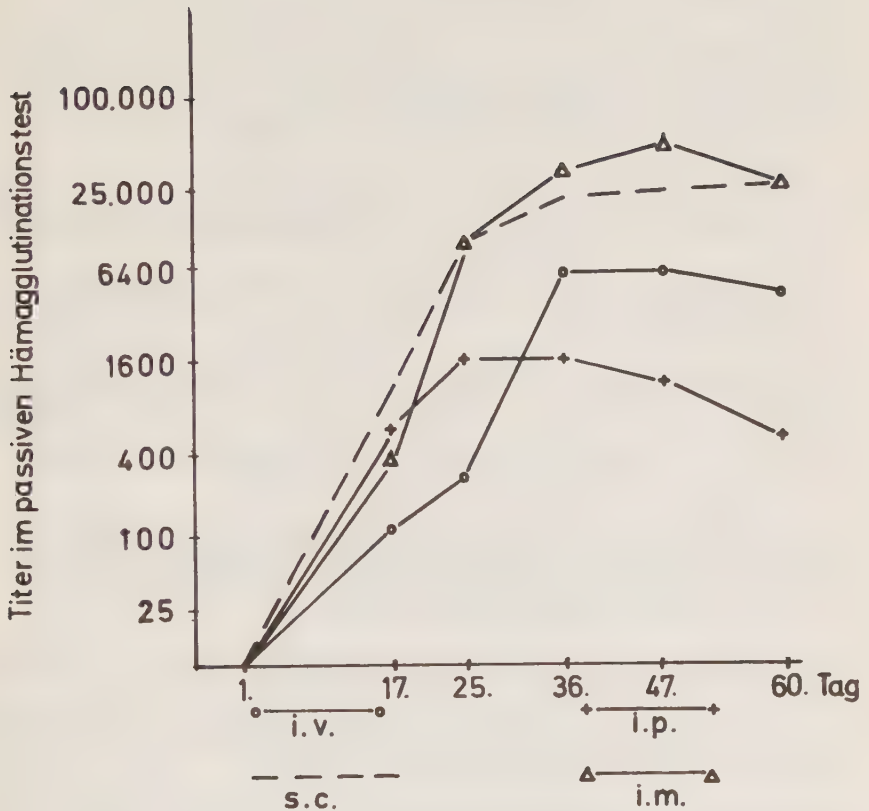


Abb. 14: Antikörpertiter nach Immunisierung auf verschiedenen parenteralen Wegen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die humorale Immunantwort wurde bei Kaninchen untersucht, die oral mit bovinem Rinderalbumin (BSA) immunisiert worden waren. Zur Erzielung einer Sekundärantwort wurde das Antigen oral, intraperitoneal, intramuskulär, intravenös und subkutan gegeben. Die Immunantwort und der Boostereffekt wurde nach Quantität, Qualität und Immunglobulinklasse der Antikörper untersucht und mit der Immunreaktion nach primärer parenteraler Antigengabe und parenteraler bzw. oraler Boosterung verglichen.

1. Nach oraler Immunisierung läßt sich durch erneute orale Antigengabe eine Sekundär- und Hyperimmunantwort erzeugen.
2. Oral immunisierte Tiere reagieren auf erneute parenterale Antigenzufuhr mit einer typischen Sekundär- und Hyperimmunantwort.
3. Es bestehen keine wesentlichen Unterschiede in der Immunantwort nach Zweitgabe des Antigens auf verschiedenen parenteralen Wegen.
4. Nach i. v. Immunisierung und oraler Zweitgabe des Antigens kommt es zu einer typischen Sekundärantwort.
5. Um einen annähernd gleichen Antikörpertiter nach Immunisierung auf oralem Wege wie nach parenteraler Antigenzufuhr zu erhalten, mußten 250 mg BSA zehnmal in Abständen von zwei Tagen oral zugeführt werden, gegenüber einer einmaligen parenteralen Antigenzufuhr von 10 mg BSA.
6. Es fanden sich praecipitierende, komplementbindende Antikörper.
7. Nach oraler Immunisierung wie nach parenteraler Immunisierung zeigten sich am 17. Tag vorwiegend IgG-Antikörper, bei einigen Seren noch Spuren von IgM. Nach Boosterung fanden sich in allen Seren nur noch IgG-Antikörper.
8. Die Sekundär- und Hyperimmunantwort nach oraler Immunisierung unterscheidet sich nicht von der nach parenteraler Immunisierung.

Es wird angenommen, daß eine mögliche lokale Immunreaktion des Darmes nach oraler Immunisierung keinen Einfluß auf die Kinetik der humoralen Antikörperbildung hat, daß aber lokale und humorale Immunreaktion nebeneinander bestehen können, und einen sich ergänzenden Schutzmechanismus bei Infektionen über die Schleimhäute darstellen. Die Frage der Antikörperbildung gegen Nahrungsproteine wird diskutiert und am Schluß die Antikörperbildung nach Antigenzufuhr auf verschiedenen parenteralen Wegen verglichen.

Literatur

1. Aiuti, F.,
Turbessi, G.,
La Cava, V.: Presenza e sintesi delle immunoglobuline nell'apparato gastro-enterico della specie umana. XI. International Congress of Microbiological Standardisation. Abstracts of communications. Mailand, S. 59, Sept. 1968
2. Aiuti, F.,
Turbessi, G.,
Ricci, G.: Formazione in vitro delle immunoglobuline da parte della mucosa orale, vaginale e della cute. XI. International Congress of Microbiological Standardisation. Abstracts of communications. Mailand, S. 60, Sept. 1968
3. Altmeier, W.,
Robbins, J.,
Smith, R.: Quantitative studies of the immunoglobulin sequence in the response of the rabbit to a somatic antigen. J.exp. Med. 124, 443 (1966)
4. Anderson, A.F.,
Schloss, O.M.: Allergy to cow's milk in infants with untri-tinal disorders: A preliminary report. Amer.J.Dis.Child. 26, 451 (1923)
5. Bauer, D.C.,
Mathies, M.J.,
Stavitzky, A.B.: Sequences of synthesis of gamma-1 macroglobulin and gamma-2 globulin antibodies during primary and secondary responses to proteins, salmonella antigens and phages. J.exp. Med. 117, 889 (1963)
6. Bauer, D.C.,
Stavitzky, A.B.: On the different molecular forms of antibody synthesized by rabbits during the early response to a single injection of protein and cellular antigens. Proc.nat.Acad.Sci. 47, 1667 (1961)
7. Bauer, J.: Über den Nachweis der präcipitablen Substanz der Kuhmilch im Blute atrophischer Säuglinge. Berl.klin.Wschr. 43, 711 (1906)
8. Bazzi, C.,
Cattaneo, R.,
Mignone, V.: XI. International Congress of Microbiological Standardisation. Abstracts of communications. Mailand, S. 64, Sept. 1968
9. Benedict, A.A.,
Brown, R.I.,
Hersh, R.T.: The temperal synthesis and some chromatographic and ultracentrifugal characteristics of chicken antibodies. J.Immunol. 90, 399 (1963)
10. Besredka, A.: Die lokale Immunisierung. A. Barth, Leipzig (1926)
11. Borgström, B.,
Dahlquist, A.,
Lundh, G.,
Sjövall, J.: Studies of intestinal digestion and absorption in the human. J.clin.Invest. 36, 1521 (1957)

12. Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J.exp.Med.* 93, 107 (1951)
13. Brandtzaeg, P., Fjellanger, I., Gjeruldsen, S.T.: Immunoglobulin M: Local synthesis and selective secretion in patients with immunoglobulin A deficiency. *Science* 160, 789 (1968)
14. Cebra, J.J., Robbins, J.B.: Gamma-A immunoglobulin from rabbit colostrum. *J.Immunol.* 97, 12 (1966)
15. Collins-Williams, C.: Cow's milk allergy in infants and children. *Int.Arch.Allergy* 20, 38 (1962)
16. Crabbe, P.A., Carbonara, A.O., Heremans, J.F.: The normal human intestinal mucosa as a major source of plasmacells containing gamma-A-globulin. *Lab.Invest.* 14, 235 (1965)
17. Crabbe, P.A., Barzin, H., Nash, D.R.: Studies on the immunoglobulins of the mouse intestine. XI. International Congress of Microbiological Standardization. Abstracts of communication. Mailand, S. 61, Sept. 1968
18. Dixon, F.J., Maurer, P.H.: Specificity of the secondary response to protein antigen. *J. Immunol.* 74, 418 (1955)
19. Dixon, F.J., Maurer, P.H., Deichmiller, M.P.: Primary and specific anamnestic antibody responses of rabbits to heterologous serum protein antigens. *J.Immunol.* 72, 179 (1954)
20. Dixon, F.J., Maurer, P.H., Weigle, W.O., Deichmiller, M.P.: Rates of antibody synthesis during first, second hyperimmune responses of rabbits to bovine gamma-globulin. *J.exp.Med.* 103, 425 (1956)
21. Draper, L.R., Süßdorf, D.H.: The serum hemolysin response in intact and splenectomized rabbits following immunization by various routes. *J.infect.Dis.* 100, 147 (1957)
22. Dupont, N.: Contribution à l'étude des antigènes des globules rouges. *Zit. nach PROKOP, O., UHLENBRUCK, G.: Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen.* 2.Aufl. 1965 Edition, Leipzig
Arch.intern.Méd.exp. 9, 133 (1934)
23. Farr, S., Dickinson, W.: The transfer of antibody producing capacity from intestinal to other lymphatic tissue. *Fed.Proc.* 20, 25 (1961)

24. Farr, S., Dickinson, W., Smith, K.: Quantitative aspects^{of}/oral immunization against BSA. Fed. Proc. 19, 199 (1960)
25. Farr, S., Dixon, F.J.: The effect of antigen concentration on the initiation of detectable antibody synthesis in rabbits. J. Immunol. 85, 250 (1960)
26. Felsenfeld, O.: Standardization of the measurement of cellbound antibody responses in enteric infections. XI. International Congress of Microbiological Standardization. Abstracts of communication. Malland, S. 62, Sept. 1968
27. Freeman, M.J.: Heterogenicity of the antibody response of rabbits immunized with acrylic particle-bovine serum albumin complexes. J. Immunol. 15, 481 (1968)
28. Freeman, M.J., Stavitzky, A.B.: Radioimmunelectrophoretic study of rabbit anti-protein antibodies during the primary response. J. Immunol. 95, 981 (1965)
29. Gelzayd, E.A., Kraft, S.C., Fitch, F.W.: Immunoglobulin A: Localization in rectal mucosal epithelial cells. Science 157, 930 (1967)
30. Grey, H.M.: Studies on changes in the quality^{of}/rabbit-bovine serum albumin antibody following immunization. J. Immunol. 7, 82 (1964)
31. Gruskay, F.L.; Cooke, R.E.: Gastrointestinal absorption of unaltered protein in normal infants and in infants recovering from diarrhea. Pediatrics 16, 763 (1955)
32. Gunther, M., Aschaffenburg, R., Mathews, R.H., Parrish, W.E., Coombs, R.R.A.: The levels of antibody to the proteins of cow's milk in the serum of normal human infants. J. Immunol. 3, 296 (1960)
33. Gyorgy, P., Moro, E., Witebsky, E.: Milchantikörper im Serum von Säuglingen. Klin. Wschr. 10, 821 (1931)
34. Heiner, D.S., Sears, J.W., Kniker, W.T.: Multiple precipitins to cow's milk in chronic respiratory disease. Amer. J. Dis. Child. 103, 634 (1962)
35. Heiner, D.C., Wilson, J.F., Lahey, M.E.: Sensitivity to cow's milk. J. Amer. med. Ass. 189, 563 (1964)

36. Helmkamp, R.W.,
Goodland, R.L.,
Bale, W.F.,
Spar, I.L.,
Mutschler, L.E.: High specific activity iodination of gamma globulin with iodine-131 monochloride. Cancer Res. 20, 1495 (1960)
37. Holland, N.H.,
Hong, R.,
Davis, N.C.,
West, C.D.: Significance of precipitating antibodies to milk proteins in the serum of infants and children. J. Pediat. 61, 181 (1962)
38. Hurliman, J.,
Zuber, C.: In vitro protein synthesis by human salivary glands. I. Synthesis of salivary IgA and serum proteins. Jmmunology 14, 809 (1968)
39. Kabat, E.A.,
Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry. 2.Edition, Thomas, Springfield S.120 (1961)
40. Kabat, E.A.,
Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry. 2. Edition, Thomas, Springfield S. 159 (1961)
41. Keller, R.,
Dwyer, J.E.: Studies on the neutralization of poliovirus by fecal immunoglobulins. The developement of intestinal IgA antibodies following oral poliovirus immunization. XI. International Congress of Microbiological Standardization. Abstracts of communication. Mailand, S. 62 Sept. 1968
42. Killander, J.,
Bengtsson, S.,
Philipson, L.: Fractionation of human plasma macroglobulins by gel filtration on pearl condensed agar. Proc. Soc.exp.Biol. 115, 861 (1964)
43. Kivel, R.M.,
Kearns, D.H.,
Liebowitz, D.: Significance of antibodies to dietary proteins in the serums of patients with nontropical sprue. New Engl.J.Med. 271, 769 (1964)
44. Körner, W.,
Massen, W.,
Pettenkofer H.J.: Über die Entstehung der ABO Isoantikörper beim Säugling. Z.Immunol.-Forsch. 123, 473 (1962)
45. Korenblat, Ph.E.,
Rothberg, R.M.,
Minden, P.,
Farr, R.S.: Immune responses of human adults after oral and parenteral exposure to bovine serum albumin. J.Allergy 41, 226 (1968)
46. Leskowitz, S.,
Waksman, B.H.: The effect of route of injection of bovine serum albumin in Freund adjuvant on production of circulating antibody and delayed hypersensitivity. J.Immunol. 84, 58 (1960)
47. Lippard, V.W.,
Schloss, O.M.,
Johnson, P.A.: Immune reaction induced in infants by intestinal absorption of incompletely digested cow's milk protein. Amer.J.Dis.Child. 51, 562 (1936)

48. Löffler, F.: Über Immunisierung per os.
in: v.Leuthold, Gedenkschrift I S.247 (1906)
49. Matthews, D.M.: Absorption und Malabsorption von Eiweiß-
verdauungsprodukten.
Klin.Wschr. 47, 398 (1969)
50. Moro, E.: Kuhmilchpräzipitin im Blute eines viereinhalb
Monate alten Atrophikers.
Münch.med.Wschr. 5, 210 (1906)
51. Nossal, G.J.V.,
Austin, C.M.,
Ada, G.L.: Antigens in immunity. VII. Analysis of immuno-
logical memory.
J.Immunol. 9, 333 (1965)
52. Nossal, G.J.V.,
Szenberg, A.,
Ada, G.L.,
Austin, C.M.: Single cell studies on 19S antibody production.
J.exp.Med. 119, 485 (1964)
53. Oriol, R.,
Tolone, G.: Immunoglobulins in rat stool.
XI. International Congress of Microbiological
Standardization. Abstracts of communications.
Mailand, S. 63, Sept. 1968
54. Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels.
Acta Path. microbiol.scand. 26, 507 (1949)
55. Peterson, R.D.A.,
Good, R.A.; Antibodies to cow's milk proteins: their
presence and significance.
Pediatrics 31, 209 (1963)
56. Pettenkofer, H.J.,
Bickerich, R.: Über die Antigengemeinschaft zwischen den
menschlichen Blutgruppen ABO und den Erregern
gemeingefährlicher Krankheiten.
Zbl.Bakt.I Orig. 179, 433 (1960)
57. Pettenkofer, H.J.,
Maassen, W.,
Bickerich, R.: Antigengemeinschaft zwischen menschlichen
Blutgruppen und Enterobacteriaceen.
Z.Immun.-Forsch. 119, 415 (1960)
58. Pike, R.M.,
Schulze, M.L.,
Sulkin, S.E.: Production of 7S and 19S antibodies to the
somatic antigens of S. typhosa in rabbits.
Proc.Soc.exp.Biol. 115, 829 (1964)
59. Raettig, H.: Tierexperimente zur Durchlässigkeit des
Intestinaltraktes für Virus.
Zbl.Bakt.I Orig. 191, 97 (1963)
60. Raettig, H.: Die aktive Immunisierung, gestern, heute und
morgen.
Wien.med.Wschr. 113, 366 (1964)
61. Raettig, H.: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen
Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 1.Mitt.:
Der Grundversuch zur Schutzimpfung der Maus
gegen eine Enteritis-Infektion.
Zbl.Bakt.I Orig. 193, 398 (1964)

62. Raettig, H.: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 2.Mitt.: Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Maus. Zbl.Bakt.I Orig. 197, 368 (1965)
63. Raettig, H., Buse, A.: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 4.Mitt.: Serum-Antikörper der Maus nach spz. Impfung gegen Salmonellen-Enteritis. Zbl.Bakt.I Orig. 204, 221 (1967)
64. Ratner, B., Gruehl, H.L.: Passage of native proteins through the normal gastrointestinal wall. J.clin.Invest. 13, 517 (1934)
65. Rossen, R.D., Sheldon, M.W., Butler, W.T.: The antibody response in nasal washings and serum to S.typhosa endotoxin administered intravenously. J.Immunol. 99, 1246 (1967)
66. Rossetini, S.M.O., Levanon, Y., Raettig, H.: Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 7.Mitt.: Nachweis von Reaginen im Serum und in Dünndarmzellen oral geimpfter Laboratoriumstiere. Zbl.Bakt. I Orig. 208, 16 (1968)
67. Rothberg, R.M., Farr, R.S.: Antibovine serum albumin and anti-alphalactalbumin in the serum of children and adults. Pediatrics 35, 571 (1965)
68. Rothberg, R.M., Farr, R.S.: Antibodies in rabbits fed milk and their similarities to antibodies in some human sera. J.Allergy, 36, 450 (1965)
69. Rothberg, R.M., Kraft, S.C., Farr, R.S.: Similarities between rabbit antibodies produced following ingestion of bovine serum ~~albumin~~ albumin and following parenteral immunization. J.Immunol. 98, 386 (1967)
70. Santos-Buch, C.A., Guzman-Rivero J.R.: Isolation of protein antigen following extraction of lipids from sheep red blood cell stroma. I. Hemolytic IgM primary response and hemolytic IgG secondary response in rabbits. J.Immunol. 100, 475 (1968)
71. Schelling, M.E., Silverman, P.H.: The effect of route of injection upon development of circulating antibody in response to variety of antigens. Immunology 14, 781 (1968)
72. Schloss, O.M., Worthen, T.: The permeability of the gastro-enteric tract of infants to undigested protein. Amer.J.Dis.Child. 11, 342 (1916)
73. Sewell, P., Cooke, W.T., Cox, E.V., Meynell, M.J.: Milk intolerance in gastrointestinal disorders. Lancet 2, 1132 (1963)

74. Smith, C.B.,
Bellanti, J.A.,
Chanock, R.M.: Immunglobulins in serum and nasal secretions following infection with type 1 parainfluenza virus and injection of inactivated vaccines. *J.Immunol.* 99, 133 (1967)
75. Sonak, R.,
Gillert, K.-E.,
Pichl., H.: Untersuchungen zur Objektivierung der Ablesung der indirekten Hämagglutination nach Boyden. *Zbl.Bakt.I Orig.* 208, 265 (1968)
76. Springer, G.F.,
Horton, R.,
Forbes, M.: Origin of anti-human blood group B agglutinins in white leghorn chicks. *J.exp.Med.* 110, 221 (1959)
77. Springer, G.F.,
Tritel, H.,
Leuterer, W.: Blood group isoagglutinin stimulation by feeding dead blood group active E. coli 086 VIII. *Intern.Congr.f.Microbiol.* (1962)
78. Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart S.10 (1968)
79. Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.593 (1968)
80. Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 74 (1968)
81. Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.614 (1968)
82. Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.654 (1968)
83. Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 87 (1968)
84. Stelos, P.,
Taliaferro, L.G.,
d'Alesandro, P.A.: Comparative study of rabbit hemolysins to various antigens: III. Chromatographic analysis of Forssman hemolysins induced by various antigens. *J.Infect.Dis.* 108, 113 (1961)
85. Svehag, S.-E.,
Mandel, B.: The formation and properties of poliovirus-neutralizing antibody: I. 19S and 7S antibody-formation: Differences in kinetics and antigen dose requirement for induction. *J.exp.Med.* 119, 1 (1964)
86. Taylor, K.B.,
Truelove, S.C.: Circulating antibodies to milk proteins and ulcerative colitis. *Brit.med.J.* 2, 924 (1961)

87. Taylor, K.B.,
Truelove, S.C.,
Thomson, D.L.,
Wright, R.: An immunologic study of coeliac disease and idiopathic steathorrhea.
Brit.med.J., 2, 1727 (1961)
88. Thornard, J.C.,
Dalbow, M.H.; Local cellular antibodies: I. Plaque formation by sensitized oral mucosal cells from conventional animals.
J.Immunol. 95, 209 (1965)
89. Tomasi, T.B.,
Tan, E.M.,
Solomon, A.,
Pendergast, R.A.: Characteristics of an immunsystem common to certain external secretions.
J.exp.Med. 121, 101 (1965)
90. Uhr, J.W.,
Finkelstein, M.S.,
Baumann, J.B.: Antibody formation: III. The primary and secondary antibody response to bacteriophage ϕ X 174 in guinea pigs.
J.exp.Med. 115, 655 (1962)
91. Uhr, J.W.,
Finkelstein, M.S.,
Franklin, E.C.: Antibody response to bacteriophage ϕ X 174 in non-mammilian vertebrates.
Proc.Soc.exp.Biol. 111, 13 (1962)
92. Uhr, J.W.,
Möller, G.: Advances in Immunology.
Edited by Dixon, F.J., Kunkel, H.G.
Academic Press New York/London 8, 109 (1968)
93. Vogt, A.,
Gibb, B.,
Prokop, O.: Versuch der peroralen Immunisierung mittels Blutgruppensubstanzen.
Vortrag 3. Arbeitstagung der Sekt.Gerichtsmedizin, Leipzig, Okt. (1964)
94. Volkheimer, G.: Zur Pathophysiologie der Dünndarmresorption - das Phänomen der Persorption.
Aktuelle Kongreßberichte 2. - 17.Ärzt. Fortbildungskurs, Bad Kissingen, S. 61 (1967)
95. Walzer, M.: Studies in absorption of indigest protein in human beings. I. A simple direct method of studying absorption of undigested protein.
J.Immunol. 14, 143 (1927)
96. Wassermann,
Citron: Über die Bildungsstätten der Typhusimmunkörper.
Z.Hyg.Infekt.-Kr. 50, 332 (1905)
97. Webster, R.G.: The immuneresponse to influenza virus.
I. Effect of the route and schedule of vaccination on the time course immune response, as measured by three serological methods.
Immunology 9, 501 (1965)
98. Williams, C.,
Chase, M.W.; Methodes in Immunology and Immunochemistry.
II. Physical and chemical methodes.
Academic Press, New York, London (1968)

99. Yagi, Y.,
Maier, P.,
Pressman, D.: Immunelectrophoretic identification of guinea
pig anti-insulin antibodies.
J.Immunol. 89, 736 (1962)
100. Yagi, Y.,
Maier, P.,
Pressman, D.: Multiplicity of insulin binding antibodies in
human sera. Presence of antibody activity in γ -,
S2A-, and S2M-globulins.
J.Immunol. 90, 760 (1963)

Herrn Prof. Dr. H. Raettig danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, für die Unterstützung bei der Organisation der Versuche und vor allem für die stets offene Bereitschaft über die Fragen, die sich während der Arbeit ergaben, zu diskutieren. Die Anregungen daraus haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Y. Levanon danke ich für die Einführung in die immunologische Arbeit,

Herrn Dir. Dr. W. Uecker für die Anleitung bei den Arbeiten mit radiomarkierten Substanzen,

Herrn Dr. H. Pichl für die Hilfe an der Ultrazentrifuge und

Herrn Dr. R. Mosbach für die Einführung in die Technik der Säulenchromatographie.

LEBENS LAUF

Am 20. 8. 1939 wurde ich als dritter Sohn des Angestellten Emil Lefèvre und seiner Ehefrau Helena in Pulsnitz geboren.

Die Grundschule besuchte ich von 1945 bis 1950 in Pulsnitz, von 1950 bis 1956 das Progymnasium in Xanten, von dem ich mit der Mittleren Reife abging. Bis zum Abitur im Jahre 1959 besuchte ich das Städt. Gymnasium in Warburg.

An der Freien Universität Berlin studierte ich Medizin und schloß das Studium mit dem Staatsexamen ab.

Als Medizinalassistent war ich in verschiedenen Kliniken Berlins und in Braunschweig tätig. Im November 1967 erhielt ich die ärztliche Approbation.

Seit Januar 1968 arbeite ich im Robert Koch-Institut in Berlin.

